TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS PEDECIBA BIOLOGÍA - SUB ÁREA BIOQUÍMICA

# Fe-superóxido dismutasas y hemoperoxidasa híbrida tipo A (APx-CcP) en *T. cruzi*

Aspectos enzimológicos, mecanísticos y su rol en la virulencia



MARIA ALEJANDRA MARTINEZ D'ALTO ORIENTADORES: Dr. Rafael Radi Dra. Lucía Piacenza





Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina Universidad de la República y Centro de Investigaciones Biomédicas

> Montevideo – Uruguay 2018

- A mis padres, porque sin ellos no estaría acá
- A Fede, por compartir su camino con el mío

"Ir y venir, seguir y guiar, dar y tener, entrar y salir de fase. Amar la trama más que el desenlace". Jorge Drexler

# Índice

lesumen	
ntroducción	
Trypanosoma cruzi	
• Epidemiología	
• Ciclo de vida	
Macrófagos en la respuesta contra T. cruzi	5
Especies reactivas derivadas del macrófago	8
<ul> <li>Radical superóxido y NOX-2</li> </ul>	8
<ul> <li>Acidificación del fagosoma y radical perhidroxilo</li> </ul>	
<ul> <li>Peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo</li> </ul>	12
<ul> <li>Inducción de la óxido nítrico sintasa y producción de •NO</li> </ul>	14
<ul> <li>Peroxinitrito</li> </ul>	
<ul> <li>Dióxido de nitrógeno y nitración proteica.</li> </ul>	
• Efectos de las especies reactivas sobre patógenos	21
Defensas antioxidantes de T. cruzi	23
• Tioles de bajo peso molecular	23
Sistemas enzimáticos	24
<ul> <li>Ascorbato peroxidasa</li> </ul>	26
Actividad peroxidasa	
Localización subcelular y rol en la virulencia	27
<ul> <li>Superóxido dismutasas</li> </ul>	
Reacción de dismutación	
Localización subcelular	
Estructura y relaciones evolutivas	
Nitración	
Modulación de la expresión de enzimas antioxidantes	
bjetivos	
apítulo 1. Estudio de las modificaciones nitro-oxidativas en la Fe-SODA y	Fe-SODB
puestas a peroxinitrito	
• Resumen	
• Materiales y métodos	

Resultados	47
• Discusión y conclusiones	61
Capítulo 2. Contribución de la Fe-SODB a la virulencia de T. cruzi in vitro e in vivo	
• Resumen	65
Materiales y métodos	66
Resultados	75
• Discusión y conclusiones	
Capítulo 3. Rol de aminoácidos cercanos al hemo en el mecanismo catalítico de la	<i>Tc</i> APx-
CcP y contribución a la virulencia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	
• Resumen	
Materiales y métodos	94
Resultados	
• Discusión y conclusiones	
Conclusión general y perspectivas	105
Agradecimientos	107
Bibliografía	111
Anexo - Abreviaturas	

## Resumen

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoario hemoflagelado perteneciente a la familia de los kinetoplastídeos capaz de invadir y proliferar en células de mamíferos. Los macrófagos residentes forman parte de la primera línea de defensa del huésped vertebrado. Durante la fagocitosis de T. cruzi se ensambla y activa la enzima NADPH oxidasa (NOX-2) produciendo grandes cantidades de radical superóxido (O<sub>2</sub>•-) hacia el parásito internalizado durante al menos 90 min. Asimismo, en un ambiente pro-inflamatorio, se induce la óxido nítrico sintasa macrofágica (iNOS) por lo que se producen flujos concomitantes de óxido nítrico (\*NO). El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y el \*NO reaccionan a una velocidad controlada por difusión para formar peroxinitrito, un potente agente oxidante y nitrante con actividad citotóxica comprobada hacia T. cruzi. En este sentido, T. cruzi posee un amplio y complejo sistema antioxidante que le permite defenderse del ataque nitrooxidativo del huésped, proliferar y establecer la infección. Este sistema incluye moléculas de bajo peso molecular, como la tripanotiona y el glutatión, y enzimas antioxidantes. Dentro de estas últimas podemos encontrar a dos peroxirredoxinas, dos glutatión peroxidasas, una hemoperoxidasa híbrida tipo A llamada ascorbato/citocromo cperoxidasa (*Tc*APx-CcP) y cuatro superóxido dismutasas dependientes de hierro (Fe-SODs). Estas enzimas poseen especificidad en la detoxificación de distintas especies reactivas y se localizan en diferentes compartimentos subcelulares. En esta tesis se estudian aspectos bioquímicos-mecanísticos de las isoformas mitocondrial y citosólica de las Fe-SODs (Fe-SODA y Fe-SODB respectivamente) y de la TcAPx-CcP expuestas a especies reactivas de relevancia fisiológica. Asimismo se evalúa su contribución a la invasión y proliferación en macrófagos, así como su rol en la etapa aguda de la Enfermedad de Chagas. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de las reacciones redox en proteínas y a al rol que poseen las enzimas antioxidantes en la virulencia del parásito.

## Introducción

## Trypanosoma cruzi

## Epidemiología

*Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoario hemoflagelado perteneciente a la familia de los kinetoplastídeos capaz de invadir y proliferar en células de mamíferos<sup>(1)</sup>. La enfermedad, que ha sido incluida por la OMS dentro de las enfermedades olvidadas, sigue siendo un problema de salúd pública en América Latina donde se estima que viven entre 6-7 millones de personas infectadas y 28 millones en riesgo de contraer la enfermedad (OMS-2016). Asimismo, la enfermedad se encuentra en proceso de diseminación global como resultado de la migración (personas y vectores), la co-infección con HIV, transfusiones sanguíneas y el trasplante de órganos. De hecho, un estudio realizado en 2012 estima que existen ~240.000 individuos infectados con *T. cruzi* viviendo en los Estados Unidos<sup>(2)</sup>, donde la seroprevalencia general basada en las donaciones de sangre evaluadas entre 2007 y 2008 fue de 1:27500<sup>(3)</sup>.

La transmisión de la enfermedad es vectorial, transfusional, oral y congénita. En Uruguay el principal vector transmisor (*Triatoma infestans*) ha sido erradicado, recibiendo en 2012 la certificación de la OPS/OMS como el primer país libre del insecto. Sin embargo, la presencia del vector en países limítrofes y la existencia de reservorios silvestres no eliminan el riesgo de contraer la enfermedad por esta vía. Desde 1985 el tamizaje serológico de Chagas en donantes de banco de sangre es obligatorio en nuestro país, estimándose la existencia de unas 8000-10000 personas cursando la etapa crónica de la enfermedad. De este total, se estima que un 20-30% desarrollarán formas cardíacas o digestivas de la afección y entre un 2-8% de las gestantes infectadas transmitirán el parásito al feto<sup>(4)</sup>.

### Ciclo de vida

La enfermedad de Chagas pertenece al grupo de enfermedades transmitidas por vectores, en este caso un insecto hematófago del género *Triatoma*. El ciclo de vida del parásito involucra un huésped invertebrado, en donde *T.cruzi* prolifera bajo la forma no infectiva epimastigota, y un huésped vertebrado (**Figura 1**). Los epimastigotas se transforman a la forma infectiva tripomastigota metacíclico en el sector terminal del intestino del insecto. Esta diferenciación (metaciclogénesis), le permite pre-adaptarse para invadir y sobrevivir en el nuevo huésped. Los tripomastigotas metacíclicos (expulsados en las heces del insecto luego de picar a un mamífero) invaden al huésped vertebrado vía mucosas y/o heridas en la piel donde infectan diferentes tipos celulares, proliferando en el citosol bajo la forma de amastigotas se transforman finalmente a tripomastigotas sanguíneos los cuales son capaces de lisar la célula y son responsables de la diseminación de la infección, siendo los tejidos más vulnerables el corazón, tracto digestivo y sistema nervioso<sup>(5-8)</sup>.



Figura 1. Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi.

5

## Macrófagos en la respuesta contra T. cruzi

Los macrófagos, junto a los neutrófilos y otras células reclutadas al sitio de invasión, forman parte de la primera defensa del huésped frente al ingreso de patógenos, controlando la proliferación y la diseminación de *T. cruzi*<sup>(9-11)</sup>. Los macrófagos tisulares son células fagocíticas mononucleares cuyas tres funciones principales son 1) la fagocitosis de microrganismos y/o elementos particulados 2) la presentación de antígenos a los linfocitos y 3) la liberación de mediadores inmunes denominados citoquinas.

En las décadas del 70 y 80 numerosos investigadores estudiaron la invasión y multiplicación de *T. cruzi* en macrófagos<sup>(11-20)</sup>. En estas células, la fagocitosis es el mecanismo de entrada principal y juega un papel fundamental tanto para el parásito como para el hospedero<sup>(21)</sup>. Inicialmente ocurre una expansión de la membrana plasmática del macrófago que rodea al parásito y deriva en la formación de la vacuola parasitófora. Un dato interesante respecto a dicha vacuola es que durante la primera hora de interacción el espacio existente entre la membrana fagosomal y la del parásito es casi nulo<sup>(22)</sup>. Este hecho, como veremos luego, repercutirá directamente en la alta concentración de moléculas microbicidas que se pueden alcanzar en el lumen del fagosoma. Posteriormente se fusionan endosomas y lisosomas cuyos contenidos contribuyen, junto a otras especies que mencionaremos más adelante, a la eliminación del parásito<sup>(7)</sup>.

En 1932 Baldridge y Gerard observaron que el proceso de la fagocitosis se acompañaba de un gran aumento transitorio del consumo de oxígeno el cual se denominó "estallido respiratorio<sup>(23)</sup>. En las siguientes décadas, se determinó en células polimorfonucleares (PMN) que dicho aumento en el consumo de oxígeno era insensible a inhibidores mitocondriales y que se acompañaba de un aumento en la ruta de las pentosas y en la producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>(24, 25)</sup>. En 1963, Iyer y Quastel sugieren por primera vez que la activación de una enzima llamada NADPH oxidasa (NOX) era la responsable de estos fenómenos durante la fagocitosis<sup>(26)</sup>. Sin embargo, recién en la década de los 70, gracias a los trabajos realizados en células de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD), se demuestra que el producto de dicha enzima era el radical superóxido  $(O_2^{\bullet})$  y no el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>(27)</sup>. Hoy en día se conoce que la NOX presente en fagocitos (NOX-2) es un complejo multienzimático que en ausencia de estímulo se encuentra inactivo. Durante la fagocitosis de T. cruzi, la sola exposición de estas células al parásito es capaz de inducir el estallido respiratorio activando el complejo enzimático de la NOX-2, el cual se ensambla en la membrana de la vacuola parasitófora, produciendo grandes cantidades de  $O_2^{\bullet-}$  y de  $H_2O_2$  hacia el parásito internalizado durante 90 min<sup>(10, 16)</sup>. La importancia de la NOX-2 en el control de la infección se demostró in vivo en ratones knockout para diferentes componentes del complejo multienzimático (p47 y gp91), los cuales presentan mayor mortalidad por *T. cruzi* que el ratón salvaje (del inglés: wild type, WT).<sup>(28, 29)</sup>

Por otro lado, pese a que ya en los años 70 se había observado que los macrófagos de ratones pre-inmunizados con BCG<sup>(12, 15)</sup> o derivados de monocitos humanos incubados con linfocitos<sup>(11)</sup> controlaban de forma más eficiente la infección, fue recién en los 80 y 90 que se comenzó a dilucidar el mecanismo detrás de este fenómeno. Por un lado, se determinó tanto *in vitro* en macrófagos<sup>(30-35)</sup> como *in vivo* en ratones<sup>(36-38)</sup> que la citoquina interferónγ (IFN-γ) cumplía un rol fundamental en el control de la infección por parásitos intracelulares, entre ellos *T. cruzi*. En 1989, Stuehr y col. mostraron que los macrófagos murinos activados liberaban una molécula derivada de la L-arginina con actividad y reactividad química igual a la del óxido nítrico (\*NO)<sup>(39)</sup>. Dicha producción era mucho mayor y duraba mucho más tiempo que la que se había determinado anteriormente en células endoteliales. Dado que el IFN-γ aumentaba la producción de \*NO en macrófagos murinos<sup>(40-42)</sup>, y que los efectos del IFN-γ observados en macrófagos *in vitro* eran revertidos en presencia de inhibidores de la síntesis de dicho radical<sup>(30-32, 34, 35)</sup>, se atribuyó al \*NO al menos parte de los efectos del IFN-γ en el control de *T. cruzi*. Esta hipótesis fue confirmada *in vitro*, utilizando dadores de \*NO a concentraciones fisiológicas, donde se observó que esta especie era tóxica para *T. cruzi*<sup>(43, 44)</sup>, y también se confirmó *in vivo* en infecciones experimentales en ratones<sup>(36, 37, 43-45)</sup>. En conjunto, estos trabajos sugieren una participación activa del \*NO en el control de la parasitemia y disminución de la mortalidad por *T. cruzi*, aunque existe cierta discrepancia al respecto en la literatura<sup>(46)</sup>.

En sistemas biológicos la producción simultánea de  $O_2^{\bullet-}$  y •NO deriva, en una reacción controlada por difusión ( $k = 4-16 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>(47-50)</sup>, en la producción de una especie reactiva con mayor poder citotóxico que sus precursores denominada peroxinitrito. Este término engloba dos especies: el peroxinitrito anión (ONOO<sup>-</sup>) y su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso (ONOOH). En 1992, Ischiropoulos y col. mostraron que los macrófagos eran capaces de sintetizar esta molécula y, más adelante, Álvarez y col. concluyeron que el peroxinitrito derivado del macrófago era una potente molécula citotóxica hacia *T. cruzi*<sup>(10, 22)</sup>.

En resumen, ya sea directamente o gracias a la acción de sus productos derivados, las especies reactivas provenientes del macrófago (algunas de ellas mencionadas anteriormente) contribuyen a eliminar el parásito dentro del fagosoma. Estas especies se clasifican en dos grandes grupos: especies reactivas derivadas del oxígeno (del inglés: reactive oxygen species, ROS) y especies derivadas del nitrógeno (del inglés: reactive nitrogen species, RNS). El primer grupo comprende al  $O_2^{\bullet-}$ , el  $H_2O_2$ , el radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ) y el radical carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ); y el segundo, al  $^{\bullet}NO$ , el peroxinitrito, el nitrosoperoxocarboxilato ( $ONOOCO_2^{-}$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $^{\bullet}NO_2$ ) (figura 2). Como se mencionó anteriormente, el espacio existente entre la membrana fagosomal y la del parásito es casi inexistente en la primera hora de invasión<sup>(22)</sup>, por tanto es de esperar que las concentraciones de ROS/RNS dentro del fagosoma sean extremadamente altas y tóxicas para el parásito<sup>(22, 51)</sup>.



Figura 2. Especies reactivas derivadas de la función macrofágica. Adaptado de Fang, 2004<sup>(52)</sup>.

Luego de la fagocitosis, aquellos parásitos que logran sobrevivir a la acción microbicida de los macrófagos son capaces de lisar la vacuola parasitófora y replicarse en el citosol<sup>(1, 6, 7)</sup>. Los tripomastigotas remueven residuos de ácido siálico de la membrana vacuolar convirtiéndola sensible a la acción de Tc-TOX, un péptido que, a pH ácido (actividad máxima a pH 5.5), forma poros y contribuye, junto con otras enzimas secretadas, a la fragmentación de la vacuola<sup>(7, 53-55)</sup>. Es interesante notar que la acidificación del fagosoma es un paso esencial en este proceso y que un aumento de pH determina que el parásito no logre salir de la vacuola<sup>(55)</sup>. En paralelo a la desintegración de este compartimento, los tripomastigotas se diferencian a amastigotas y al ingresar al citosol comienzan a proliferar. Esta división ocurre hasta que prácticamente ocupan todo el espacio disponible dentro de la célula y es en ese momento, previo a la lisis celular, que los amastigotas se vuelven a transformar en tripomastigotas. Finalmente, los parásitos liberados invaden células adyacentes o se diseminan por el torrente sanguíneo a otros tejidos u órganos.

A continuación se comentará en detalle las especies reactivas derivadas del macrófago más relevantes para este trabajo.

#### Especies reactivas derivadas del macrófago

#### Radical superóxido y NOX-2

#### Propiedades del O<sub>2</sub>•-

El radical aniónico O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es el resultado de la reducción univalente del O<sub>2</sub> (Ec.1).

 $O_2 + e^- \to O_2^{\bullet -}$  Ec. 1

El  $O_2$  es un bi-radical estable, con dos electrones desapareados en su orbital pi. En ocasiones, estos electrones interaccionan con electrones desapareados de metales de transición o radicales orgánicos y generan  $O_2^{\bullet-}$ , lo cual puede ocurrir en sistemas biológicos de forma deliberada o como un producto secundario no deseado de otras reacciones de óxido-reducción.

Desde el punto de vista redox, el  $O_2^{\bullet-}$  es un moderado agente reductor y oxidante **(figura 3)**. Es capaz de reducir por un electrón a una gran variedad de metales de transición, como por ejemplo al hierro (Fe<sup>+3</sup>) del citocromo c (Cyt c)<sup>(56)</sup> y de oxidar centros hierro-sulfurados (Fe-S)<sup>(57-62)</sup>. Asimismo, pese a que no reacciona con la mayoría de los compuestos orgánicos, selectivamente es capaz de oxidar a algunos de ellos<sup>(63)</sup>. En contraste, el  $O_2^{\bullet-}$  reacciona a velocidades controladas por difusión con otros radicales, como ser el •NO, el radical fenoxilo y el radical indólico<sup>(64)</sup>.



Figura 3. Diagrama de estados de oxidación del oxígeno (PO<sub>2</sub> = 1 atm, T = 25°C) a pH 7. Adaptado de Imlay, 2003(65).

El  $O_2^{\bullet-}$  es una especie estable en solvente apróticos o a pHs alcalinos extremos. Sin embargo, en la célula se considera una especie transitoria ya que dismuta espontáneamente ( $k = 2-3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4)<sup>(66, 67)</sup> generando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. La dismutación espontánea depende del pH (figura 4), por lo que tendrá velocidades distintas a pH citosólico o al pH del fagosoma, siendo más rápida a pH ácidos que alcalinos.

**Figura 4.** Constantes de reacción observadas de la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  en función del pH. *Tomado de Bielski y O. Allen, 1977*<sup>(66)</sup>.



#### Producción de O2<sup>•-</sup> en la célula

Los organismos vivos fisiológicamente producen flujos sostenidos de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. La cadena de transporte de electrones y las diferentes isoformas de la NOX se encuentran dentro de las fuentes más conocidas de este radical.

En la membrana interna mitocondrial de células eucariotas o en la membrana plasmática de bacterias la producción normal de  $O_2^{\bullet-}$  es relativamente baja. Se estima que entre un 0.1-0.5 % del  $O_2$  consumido en la mitocondria se transforma en  $O_2^{\bullet-(68, 69)}$ . Sin embargo, durante la fagocitosis o en algunas condiciones patológicas, la producción puede aumentar significativamente, alcanzando flujos potencialmente tóxicos para la célula **(tabla 1)**.

**Tabla 1.** Flujos y concentraciones en estado estacionario del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

Condición	Flujo (µM/s)	[O <sub>2</sub> •-]ss (M)	Ref.
Mitocondria de hígado de rata	0.6	0.83 x 10 <sup>-10</sup>	(70)
E. coli	5	2 x 10 <sup>-10</sup>	(71)
BAECs 5mM glucosa	0.7	2.85 x 10 <sup>-8</sup>	(72)
BAECs 30mM glucosa	6	2.5 x 10 <sup>-7</sup>	(72)
Fagosoma del neutrófilo	5200	2.5 x 10 <sup>-5</sup> (1mM MPO)	(73)
		1 x 10 <sup>-4</sup> (sin MPO)	

Varios centros redox presentes en las células son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al  $O_2$  y formar  $O_2^{\bullet-}$ , incluyendo flavoproteínas, centros Fe-S y semiquinonas<sup>(65, 74)</sup>. La eficacia en esta reacción dependerá, entre otros, de la exposición del centro al solvente y que éste se encuentre en su forma reducida<sup>(65, 75)</sup>.

Pese a que existe producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> como producto secundario de otras reacciones en la célula, ésta es muchísimo menor que la que se produce mediante el ensamblado y activación de la NOX-2. Durante la fagocitosis la producción mediada por dicho complejo multienzimático es 2-3 órdenes de magnitud mayor, siendo la función principal del sistema y alcanzando concentraciones de estado estacionario muy altas con gran potencial de daño a patógenos **(tabla 1)**. Ya en 1973, cuando Babior y col. reportaron por primera vez la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en leucocitos sugirieron que este radical, así como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podría participar en el proceso de daño a microorganismos<sup>(76)</sup>.

Estructuralemnte, la NOX-2 es un complejo enzimático conformado por 6 subunidades **(figura 5)**: dos proteínas transembrana (gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>) que forman el heterodímero flavocitocromo  $b_{558}$ , tres proteínas reguladoras citosólicas: p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> y una GTPasa Rac<sup>(77-79)</sup>. En reposo, las proteínas reguladoras se encuentran en el citosol y el complejo NOX está desensamblado e inactivo. Tras la activación en respuesta a estímulos



quimiotácticos o a partículas fagocitables, los componentes citosólicos sufren una serie de modificaciones covalentes y cambios conformacionales que inducen su translocación hacia la membrana. Luego de su asociación con gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> se forma el complejo activo y se produce  $O_2^{\bullet-}$  hacia adentro del fagosoma o hacia afuera de la célula<sup>(80)</sup>. En el caso de *T. cruzi*, la sola interacción del parásito con el macrófago es capaz de ensamblar y activar a la NOX-2<sup>(10, 16)</sup>.

Figura 5. Ensamblado de la NOX-2. Adaptado de Bedard y Krause, 2007<sup>(78)</sup>.

El complejo flavocitocromo  $b_{558}$  constituye el núcleo catalítico del sistema conectando el dador de electrones (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, NADPH) del lado citosólico de la membrana con el aceptor de electrones (O<sub>2</sub>) del lado opuesto. Durante la reacción, ocurren una serie de transferencia de electrones que involucran un dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y dos grupos hemo asimétricos (figura 6)<sup>(78)</sup>. Dado que el NADPH cede dos electrones y que el O<sub>2</sub> acepta uno sólo, por cada mol de NADPH consumido se producen dos moles de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

**Figura 6.** Transferencia de electrones desde el NADPH hasta el  $O_2$  en la NOX-2. *Figura tomada de Cifuentes-Pagano*, 2013<sup>(81)</sup>.

La producción de  $O_2^{\bullet}$  no ocurre indefinidamente sino que lo hace por un tiempo limitado. Durante la fagocitosis de *T. cruzi*, por ejemplo, se determinó que la producción de  $O_2^{\bullet}$ mediada por la NOX-2 ocurre durante 60-90 min<sup>(22)</sup>. Durante dicho lapso de tiempo es que ocurren la mayoría de los eventos nitroxidativos de la fagocitosis que serán clave para esta tesis.



Un aspecto muy importante a tener en cuenta sobre el  $O_2^{\bullet-}$  es que posee una baja permeabilidad de membrana (2 x 10<sup>-6</sup> cm/s<sup>(82)</sup>). Esto determina que la mayor parte de las veces su presencia se limite principalmente a su sitio de producción, en este caso el lumen del fagosoma. Sin embargo, existen reportes de que el  $O_2^{\bullet-}$  es capaz de utilizar canales aniónicos<sup>(83)</sup> y por tanto, la permeabilidad podría aumentar en función de la abundancia de dichos canales en la membrana. En el caso de *T. cruzi*, varios canales de Cl<sup>-</sup> fueron identificados bioinformáticamente en el genoma de la cepa Dm28c<sup>(84)</sup> y existen también evidencias experimentales que fuertemente sugieren su presencia<sup>(85, 86)</sup>. Si el  $O_2^{\bullet-}$  utilizara dichos canales la permeabilidad del  $O_2^{\bullet-}$  hacia *T. cruzi* sería mayor que la previamente reportada.

#### Blancos celulares directos del superóxido

Un hito en la historia del  $O_2^{\bullet-}$  fue el descubrimiento por McCord y Fridovich de una enzima que era capaz de eliminar a este radical, llamada superóxido dismutasa (SODs; EC 1.15.1.1)<sup>(87)</sup>. La presencia de estas metaloenzimas en la célula no solo demostró que el  $O_2^{\bullet-}$ era producido por las mismas sino que era potencialmente tóxico. El hecho de que las SODs se encuentran presentes en todos los órdenes de la vida y que la expresión de la isoforma mitocondrial dependiente de manganeso (Mn-SOD) es esencial en mamíferos<sup>(88, 89)</sup> muestra la importancia de la detoxificación del  $O_2^{\bullet-}$ . En este sentido, el rol del  $O_2^{\bullet-}$  en la defensa contra patógenos es evidente por el hecho de que muchas bacterias patogénicas poseen una SOD periplasmática que les protege del estallido respiratorio <sup>(90-93)</sup>.

El  $O_2^{\bullet-}$  se encuentra atraído electrostáticamente al hierro catalítico de los centros Fe-S de algunas proteínas, como por ejemplo la aconitasa ( $k \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>(57-62)</sup>. Al unirse, el  $O_2^{\bullet-}$  oxida por un electrón al centro, el cual se desensambla y la enzima pierde actividad **(Ec. 2 y 3)**<sup>(94)</sup>. Además de este efecto directo, se piensa que gran parte del daño mediado por  $O_2^{\bullet-}$ 

se debe al Fe<sup>2+</sup> liberado durante la oxidación, ya que como veremos más adelante éste puede dar lugar a otras moléculas más reactivas, por ejemplo el radical hidroxilo (•OH).

$$[4Fe - 4S]^{2+} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow [4Fe - 4S]^{3+} + H_2O_2 \qquad \text{Ec. 2}$$
$$[4Fe - 4S]^{3+} \rightarrow [3Fe - 4S]^{1+} + Fe^{2+} \qquad \text{Ec. 3}$$

En este sentido, un trabajo interesante de Gort e Imlay muestra que en *E. coli* una disminución de sólo dos veces en la concentración de SOD es suficiente para crear un déficit detectable en la actividad de enzimas con centros Fe-S y de cuatro veces para alterar el crecimiento<sup>(95)</sup>.

Por otro lado, se observó que el  $O_2^{\bullet-}$  es capaz de inactivar a componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, como la NADH deshidrogenasa, la NADH oxidasa y la ATP sintasa<sup>(96)</sup>.

Pese a esto, pocos blancos del  $O_2^{\bullet-}$  son capaces de competirle a la dismutación por la SOD  $(k \sim 10^8 - 10^9)^{(97, 98)}$  entre los que se encuentran otras especies radicalares. El  $O_2^{\bullet-}$  reacciona a velocidades controladas por difusión con estas especies, como ser el •NO, el radical fenoxilo y el radical indólico<sup>(64)</sup>. En el caso de la reacción con •NO, como se mencionó anteriormente, se produce peroxinitrito, el cual es una molécula mucho más oxidante y citotóxica hacia *T. cruzi* que el propio  $O_2^{\bullet-(10, 22)}$ .

#### Acidificación del fagosoma y radical perhidroxilo

El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es una base débil que se encuentra en equilibrio en solventes acuosos con el radical perhidroxilo (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, pKa = 4.69-4.88)<sup>(66, 67, 99)</sup>. A pH 7.8 las cantidades de HO<sub>2</sub><sup>•</sup> son casi inexistentes (relación 1000 a 1), y es por esto que históricamente la investigación se ha centrado en los efectos del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y no en los efectos del HO<sub>2</sub><sup>•</sup> en sistemas biológicos<sup>(100)</sup>. Sin embargo, en compartimentos ácidos la proporción de HO<sub>2</sub><sup>•</sup> comienza a aumentar hasta concentraciones relevantes que podrían ser tóxicas<sup>(100)</sup>. La cinética de acidificación del fagosoma es diferente entre distintas células del sistema inmune, mostrando un rápido decaimiento en macrófagos (pH = 5-6 en 5 min)<sup>(101)</sup>. De hecho, la naturaleza ácida de la vacuola parasitófora en infecciones por *T. cruzi* es bien conocida, ya que es necesaria para que el parásito se escape de ella y se replique en el citosol<sup>(55)</sup>. Esto implica entonces que en el fagosoma se combinen tres factores que favorecen la acumulación de HO<sub>2</sub><sup>•-</sup> 1) la alta producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por la NOX-2, 2) el pequeño volumen del fagosoma y 3) su naturaleza ácida.

A diferencia del  $O_2^{\bullet-}$ , el  $HO_2^{\bullet}$  es neutro. Esto le confiere una permeabilidad de membrana un par de órdenes de magnitud mayor (9 x  $10^{-4}$  cm/s)<sup>(90)</sup>, similar a la del  $H_2O_2$  (2-16 x  $10^{-4}$ cm/s)<sup>(73, 102, 103)</sup>, y levemente menor a la del  $H_2O$  (3.5 x  $10^{-3}$  cm/s)<sup>(104)</sup>. Esto implica que, a pesar de poseer una concentración menor que el  $O_2^{\bullet-}$ , el flujo del  $HO_2^{\bullet}$  hacia el parásito podría ser mayor<sup>(51, 100)</sup>. En este sentido, trabajos previos mostraron que una cepa de *E. coli* deficiente en la SOD citosólica y periplásmica poseía un 30% de inactivación de la enzima fumarasa al ser expuesta a flujos externos de  $O_2^{\bullet-}$  a pH 6.5. En contraste, a pH 8.4, cuando la concentración de  $HO_2^{\bullet}$  era despreciable, el efecto sobre la fumarasa era mínimo<sup>(90)</sup>.

#### Daños producidos por el HO<sub>2</sub>•

El HO<sub>2</sub>• es una especie mucho más oxidante que el O<sub>2</sub>•-<sup>(51, 100)</sup>. De especial interés, dada la capacidad del HO<sub>2</sub>• de difundir en membranas, es su capacidad de iniciar la lipoperoxidación de ácidos grasos poli-insaturados ( $k = 1.18-3.05 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , Ec. 4)<sup>(105)</sup>.

 $RH + HO_2^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + H_2O_2$  Ec. 4

Por otro lado, parte del daño mediado por  $HO_2^{\bullet}$  podría provenir de la conversión a  $O_2^{\bullet-}$  luego del ingreso a compartimentos neutros o alcalinos.

#### Peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo

#### $H_2O_2$

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un oxidante que presenta características que lo diferencian de las otras especies tratadas en esta tesis: 1) no tiene carga, 2) no es un radical libre y 3) es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Su permeabilidad de membrana  $(2-16 \times 10^{-4} \text{ cm/s})^{(73, 102, 103)}$  es similar a la del HO<sub>2</sub>• y el agua lo que le permite difundir a través de membranas. Adicionalmente, se postula que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede utilizar como medio de transporte a ciertas acuoporinas (canales proteicos de H<sub>2</sub>O en la membrana) que se le denominaron peroxiporinas.<sup>(106-108)</sup>.

En el fagosoma, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce por la dismutación espontánea del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> generado por la NOX-2. Winterbourn y col. simularon la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estado estacionario dentro del fagosoma del neutrófilo en ausencia y presencia de MPO, siendo de 3.3 x 10<sup>-5</sup> M o 2 x 10<sup>-6</sup> M, respectivamente. Esta concentración es entre tres y doce veces menor que la simulada para el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (1 x 10<sup>-4</sup> M o 2.5 x 10<sup>-5</sup> M en ausencia o presencia de MPO respectivamente). La razón de esta diferencia puede ser la mayor permeabilidad de membrana y consumo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente al O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ya que la simulación en ausencia de difusión brinda una concentración mucho mayor (3 x 10<sup>-4</sup> M)<sup>(73)</sup>.

Pese a ser un fuerte oxidante de dos electrones ( $E^{o'}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O= 1.32 V) el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona de forma muy lenta con la mayoría de las moléculas biológicas, como se observa en la reacción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con tioles de bajo peso molecular y proteicos **(tabla 2)**<sup>(109)</sup>. Una excepción son los tioles particularmente reactivos de las peroxirredoxinas, proteínas encargadas de detoxificar al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula y participar en eventos de señalización celular<sup>(110, 111)</sup>.

Tiol	рКа	Constante de reacción (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
GSH	8.8	0.89
Cisteína	8.3	2.9
N-acetilcisteína	9.5	0.16
Tiorredoxina	6.5	1.05
GAPDH	8.2	~500
PTP1B	5.4	20
Cdc25B	6.1	160
Peroxirredoxinas	5-6	1-4 x 10 <sup>7</sup>

**Tabla 2.** pKa y constantes de reacción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con tioles a pH 7.4-7.6 y 37°C o 20-25°C. Adaptado de Winterbourn, 2013<sup>(109)</sup>.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también reacciona rápido con metales de transición, selenoproteínas y un grupo de proteínas llamadas hemo-peroxidasas. Ejemplos de estas enzimas son la mieloperoxidasa (MPO)<sup>(112)</sup> y la ascorbato peroxidasa (APx-CcP).

La toxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hacia *T. cruzi* fue estudiada *in vitro*<sup>(18)</sup> resultando una especie nociva para el parásito. Como veremos más adelante, *T. cruzi* posee sistemas de detoxificación específicos para defenderse de esta especie.

#### •ОН

El •OH es uno de los oxidantes más fuertes que se conocen ( $E^{o'}$  •OH/H<sub>2</sub>O = 2.31 V). Reacciona de forma inespecífica con muchas moléculas biológicas a velocidades controladas por difusión ( $k > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Debido a esta alta reactividad su vida media es extremadamente corta (~10<sup>-9</sup> s) y es la especie con menos difusión de las que se mencionan en esta tesis.

Una fuente relevante de <sup>•</sup>OH, que mencionaremos en detalle más adelante, es la descomposición del peroxinitrito. Alternativamente, el <sup>•</sup>OH se genera en sistemas biológicos mediante la reacción entre el  $H_2O_2$  y el Fe<sup>+2</sup> libre **(Ec. 5)**<sup>(113)</sup>.

 $H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + {}^{\bullet}OH$  Ec. 5

Es importante destacar que esta última reacción es una de las varias reacciones que se pueden dar entre el  $H_2O_2$  y el Fe<sup>+2</sup> (llamadas reacciones de Fenton). Estas reacciones pueden producir otros oxidantes fuertes alternativos al <sup>•</sup>OH como ser la especie oxoferrilo (Fe<sup>+4</sup>=O)<sup>(109, 113)</sup>. Posteriormente a la reacción de Fenton el Fe<sup>+3</sup> es reducido nuevamente ya sea por el  $O_2^{\bullet-}$  (ciclo Haber-Weiss, **Ec. 6**) o por otros reductores celulares (GSH, ascorbato)<sup>(109)</sup>.

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{+3} \rightarrow O_2 + Fe^{+2}$$
 Ec. 6

En condiciones fisiológicas los niveles de Fe<sup>+2</sup> libre o activo desde el punto de vista redox son extremadamente bajos, sin embargo el aumento en los niveles de  $O_2^{\bullet-}$  durante la fagocitosis y la concurrente liberación de Fe<sup>+2</sup> desde centros Fe-S lábiles favorece la producción de <sup>•</sup>OH.

La alta reactividad e inespecificidad del <sup>•</sup>OH con moléculas biológicas le confiere un poder citotóxico relativo. Esto se debe a que muchas veces la reacción ocurre con moléculas o en residuos proteicos no críticos y por tanto, no tiene efecto sobre las funciones celulares. Un caso donde existe cierta especificidad en el daño es la reacción del  $H_2O_2$  con Cu<sup>+</sup> (en vez de Fe<sup>+2</sup>) complejado al ADN en una reacción análoga a la de Fenton. En este caso la generación sitio-específica de <sup>•</sup>OH posibilita la oxidación del ADN como se muestra en la **Ec. 7**<sup>(70)</sup>, la cual puede resultar en mutaciones en el ADN y/o muerte celular como se observó en cepas de *E. coli* deficientes en SOD<sup>(95)</sup>.

 $OH + ADN - (dG) \rightarrow ADN - (8HodG)$  Ec. 7

#### Inducción de la óxido nítrico sintasa y producción de •NO

#### Propiedades del \*NO

El •NO es un radical libre relativamente estable con poca capacidad redox y por ello no reacciona de forma rápida con la mayoría de las moléculas biológicas<sup>(114)</sup>. El •NO presenta una carga neta neutra, radio molecular pequeño, y es hidrofóbico. Posee una alta permeabilidad de membrana, similar a la del O<sub>2</sub> (18 cm.s<sup>-1</sup> vs 32 cm.s<sup>-1</sup> respectivamente, **figura 7**)<sup>(115)</sup>, lo que le permite difundir fácilmente a través de las membranas lipídicas. Dicha permeabilidad indica que la mayoría de las membranas no son un factor limitante en la difusión del •NO<sup>(116)</sup>. Es más, asumiendo una vida media entre 0.5-5 s, una concentración



inicial de 1 µM en el sitio de producción y de 10 nM en el sitio de acción, la distancia recorrida por el \*NO se estima de 200-600 μm<sup>(117)</sup>. Este valor es 10-30 veces más que el diámetro de una célula y 60-300 más que el diámetro de T. cruzi. De esto se desprende que el •NO es capaz de actuar no sólo en compartimentos celulares distintos al de origen sino también en células vecinas (acción parácrina).

**Figura 7.** Clasificación de las especies reactivas en función de su capacidad de difundir a través de membranas. Pm/Pw es la relación entre la permeabilidad de membrana y la permeabilidad a través de una capa equivalente de agua. *Adaptado de Moller y col., 2008*<sup>(115)</sup>.

#### Producción de 'NO

El campo de estudio de la síntesis de •NO por células se inicia a finales de los 80, cuando dos grupos encuentran que el factor de relajación derivado del endotelio (del inglés: endothelium derived relaxing factor, EDRF) y el •NO eran la misma molécula<sup>(118, 119)</sup>. Un par de años después se demuestra la producción de •NO en macrófagos, el cual poseía actividad citoestática en células tumorales<sup>(120)</sup>. Además, se muestra que la producción de •NO mediada por macrófagos duraba más tiempo (> 24 h) y era mayor que en células endoteliales<sup>(39, 41)</sup> sugiriendo que la regulación de la producción de •NO era probablemente diferente en ambos tipos celulares. Las enzimas responsables de la síntesis de •NO son conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS; EC 1.14.13.39). La familia consiste en tres isoformas, la constitutiva neuronal (nNOS), la constitutiva endotelial (eNOS) y la forma inducible (iNOS). Catalizan la oxidación del grupo guanidinio de la L-arginina, generando •NO y L-citrulina como se muestra a continuación **(Ec. 7)**<sup>(121)</sup>.



La enzima activa es un homodímero, cada monómero con un dominio reductasa Cterminal, un dominio oxigenasa N-terminal y una región de unión a la proteína calmodulina



(CaM) en el medio **(figura 8)**. El dominio oxigenasa posee un sitio de unión a hemo, tetrahidrobiopterina (H<sub>4</sub>B) y Larginina y es donde la síntesis de **•**NO tiene lugar. El dominio reductasa posee sitios de unión a flavin mononucleótido (FMN), FAD y NADPH. Durante la catálisis los electrones del NADPH son transferidos desde las flavinas del dominio reductasa de un monómero al hemo del dominio oxigenasa del otro monómero, el cual une O<sub>2</sub> y permite que ocurra la síntesis de **•**NO.

Figura 8. Estructura y mecanismo de transferencia de electrones en un dímero de la iNOS. Tomado de Stuehr, 1999<sup>(121)</sup>.

La iNOS (también llamada NOS2), se encuentra en las células fagocíticas y en otros tipos celulares como fibroblastos, miocitos y células endoteliales. Lo que caracteriza y diferencia a esta isoforma es que: 1) los niveles de Ca<sup>+2</sup> basales en la célula son suficientes para que se encuentre completamente activa y 2) que aumenta su expresión luego de la inducción por estímulos pro-inflamatorios como ser el IFN- $\gamma$  y el lipopolisacárido (LPS)<sup>(40, 42)</sup>. Aunque se ha visto que moléculas derivadas de microorganismos son capaces de inducir la iNOS en macrófagos<sup>(41)</sup> y que ratones infectados con *T. cruzi* presentan niveles elevados de °NO, el parásito por sí solo en ausencia de co-estimulación no induce significativamente la expresión de la enzima<sup>(122-124)</sup>. La iNOS sintetiza mayores cantidades de °NO que las otras isoformas, aumentando la concentración en estado estacionario de esta molécula cerca de 1000 veces (de nM a  $\mu$ M). Por otro lado, la duración en su producción es de muchas horas (> 20 h), hasta que la misma es degradada<sup>(42)</sup>.

Un punto de discrepancia ha sido la existencia de la iNOS en humanos. Actualmente existen reportes en los que se detectaron un aumento en el ARNm de la enzima, en los productos derivados del •NO en la circulación y en la actividad de la enzima en células fagocíticas en humanos cursando un proceso inflamatorio<sup>(125-127)</sup>. Los macrófagos de pacientes con infecciones u otras condiciones inflamatorias expresan la iNOS<sup>(128, 129)</sup> y lo que ha generado controversia es que la estimulación de monocitos diferenciados *in vitro* no ha sido eficiente<sup>(130)</sup>. Esto último puede deberse a que la región promotora de la iNOS humana y murina es distinta por lo que los mecanismos de inducción seguramente sean diferentes.

#### Blancos celulares del 'NO

El \*NO reacciona con el O<sub>2</sub> en solución acuosa ( $k = 2-8 \times 10^6 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ )<sup>(131)</sup> produciendo intermediarios reactivos que pueden modificar aminoácidos proteicos mediante nitración, como ser el \*NO<sub>2</sub>, el óxido de nitrógeno (III) (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y el óxido de nitrógeno (IV) (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), cuyos productos finales son el nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Ec. 8-12). La reacción del \*NO con el O<sub>2</sub> es particularmente importante en membranas, ya que ambas moléculas se concentran en dicho ambiente y la reacción puede ocurrir de 30 a 300 veces más rápido<sup>(132)</sup>.

$2 \cdot NO + O_2 \rightarrow 2 \cdot NO_2$	$k = 2-8 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{s}^{-1}$	Ec. 8
$2 \cdot NO_2 \to N_2O_4$	<i>k</i> = 4.5 x 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	Ec. 9
$N_2O_4 + H_2O \rightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H^+$	$k = 1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	Ec. 10
$NO + NO_2 \rightarrow N_2O_3$	$k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Ec. 11
$N_2O_3 + H_2O \to 2NO_2^- + 2H^+$	<i>k</i> = 1.6 x 10 <sup>3</sup> s <sup>-1</sup>	Ec. 12

Otros blancos celulares muy importantes del \*NO son las hemo-, hierro- y sulfo-proteinas y otros radicales libres, como ser el O<sub>2</sub>\*-. El \*NO se une al grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa y activa la producción de GMP cíclico que induce la relajación del vaso sanguíneo<sup>(133)</sup>. Por otro lado, inhibe la respiración mitocondrial principalmente por su unión a la citocromo oxidasa<sup>(134-136)</sup>.

Por último, como ya hemos mencionado, el \*NO puede reaccionar con el O<sub>2</sub>\*\* y formar peroxinitrito en una reacción controlada por difusión. Como veremos más adelante, muchos de los efectos deletéreos del \*NO pueden explicarse por dar origen a esta especie. Durante la fagocitosis, el O<sub>2</sub>\*\* puede provenir de la NOX-2 o de la propia inhibición mitocondrial generada por el \*NO, como fue mostrado en epimastigotas de *T. cruzi* expuestos a flujos de \*NO<sup>(136)</sup>.

#### Peroxinitrito

A pesar de que ya en la década del 70 y 80 se proponía que el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> poseía un rol importante en la defensa de macrófagos contra patógenos, no fue hasta que se describieron los efectos nocivos del peroxinitrito en los años 90 que se conoció el verdadero alcance de la toxicidad mediada por este radical <sup>(137-139)</sup>.

El peroxinitrito se produce en la reacción controlada por difusión entre el  $O_2^{\bullet-}$  y el  $OO(k = 4-16 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})^{(47-50)}$ . El término peroxinitrito engloba a dos especies, el ONOO y el ONOOH. A pH 7.4 un 20% se encuentra en la forma protonada (pKa =  $6.8^{(138)}$ ) el cual puede difundir a través de membranas (constante de permeabilidad ~  $1 \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}^{(140, 141)}$  alcanzando el citosol de patógenos durante la fagocitosis. El ONOO<sup>-</sup>, por otro lado, puede utilizar canales aniónicos como por ejemplo la banda 3 de los glóbulos rojos<sup>(142)</sup>.

Durante la fagocitosis de *T. cruzi* por macrófagos, el propio proceso estimula la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durante 90 min al activar la NOX-2. En presencia de mediadores pro-inflamatorios, el macrófago es capaz de la simultánea producción de •NO y, en consecuencia se producirá

peroxinitrito. Como se mencionó anteriormente, el peroxinitrito posee actividad citotóxica demostrada hacia *T. cruzi*<sup>(10, 22, 143, 144)</sup> presentando una LD50 < 0.3 fmol/*T. cruzi*<sup>(145)</sup> (figura 9). En un trabajo previo se estimó el flujo de peroxinitrito generado por el macrófago utilizando PMA como inductor siendo de ~0.13 nmol/min/ $10^{6(146)}$ . Este valor corresponde a una velocidad máxima de ~0.2 mM/s, asumiendo un fagosoma por macrófago y un



volumen de 1 x 10<sup>-14</sup> L.

**Figura 9.** Micrografías electrónicas de la infección por *T. cruzi* en macrófagos. A la izquierda se muestra un macrófago no estimulado (CTL) y a la derecha un macrófago estimulado con IFN-γ/LPS. *Adaptado de Alvarez y col. 2011(22).* 

#### Blancos celulares del peroxinitrito

Desde el punto de vista de su reactividad química, el peroxinitrito es un oxidante fuerte de uno y dos electrones y un potente agente nitrante. Dado que el peroxinitrito posee muchos blancos reportados *in vitro*, la relevancia de cada blanco *in vivo* se puede estimar calculando la fracción de peroxinitrito que consume (F<sub>Bi</sub>, **Ec. 13**):

$$F_{Bi} = \frac{k_i[B_i]}{\sum k_n[B_n]} \qquad \text{Ec. 13}$$

Varios trabajos han utilizado esta estrategia con números crecientes de blancos intracelulares<sup>(147-149)</sup>.

Actualmente se piensa que unos pocos blancos dan cuenta de la mayoría del consumo del peroxinitrito *in vivo*: CO<sub>2</sub>, peroxidasas (hemo y seleno/tiol-dependientes) y unas pocas metaloproteínas<sup>(150)</sup> (figura 10).



**Figura 10.** Reacciones del peroxinitrito. I: Reacción directa de oxidación por un electrón con metales de transición (Fe, Mn, Cu). II: Reacción de oxidación por dos electrones con el sustrato RH. III: Reacción con CO<sub>2</sub>. IV: Homólisis del ONOOH. V: Homólisis e isomerización a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> del ONOOH. *Tomado de Radi y col.* 2001<sup>(151)</sup>.

En la ausencia de blancos directos, el ONOOH homoliza en una reacción de primer orden independiente del pH de 4.5 s<sup>-1</sup> a  $37^{\circ}C^{(152, 153)}$  (figura 10). Durante la homólisis, se forman <sup>•</sup>OH y <sup>•</sup>NO<sub>2</sub>, los cuales recombinan y forman NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o difunden hacia la solución (el rendimiento de este último proceso es de ~30%)<sup>(154, 155)</sup>. Ambos radicales son oxidantes

fuertes y pueden reaccionar con muchas moléculas biológicas. Los efectos de cada uno de ellos se discuten en su sección específica, limitándonos en esta sección a las reacciones directas del peroxinitrito.

La reacción del ONOO<sup>-</sup> con CO<sub>2</sub> ( $k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ a} 37^{\circ}\text{C}$ )<sup>(156)</sup> es una de las más relevantes fisiológicamente ya que posee un alto valor de ki[Bi]. Da como producto el aducto inestable ONOOCO<sub>2</sub>-<sup>(157)</sup> el cual puede dar como producto CO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o CO<sub>3</sub><sup>--</sup> y NO<sub>2</sub><sup>+-</sup> (figura 10 y Ec. 14). En este caso, el rendimiento de la segunda reacción es mayor que la producción de <sup>•</sup>OH y <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> en la homólisis del peroxinitrito. Por tanto, en presencia de CO<sub>2</sub> la producción radicalar es mayor.

$$ONOO^- + CO_2 \rightarrow ONOOCO_2^- \rightarrow 0.35(CO_3^{\bullet-} + {}^{\bullet}NO_2) + 0.65(CO_2 + NO_3^-)$$
 Ec. 14

El peroxinitrito reacciona con varias metaloproteínas a velocidades considerables, siendo las hemoproteínas las que suelen tener las velocidades mayores<sup>(150)</sup>. La reacción entre el peroxinitrito y las hemoproteínas no siempre dan el mismo producto y deben de ser estudiadas caso a caso **(figura 11)**. La lista de metaloproteínas que reaccionan con el peroxinitrito es extensa, sólo por nombrar un par de ejemplos relevantes nombraremos a dos importantes en la función mitocondrial: la citochromo oxidasa<sup>(158, 159)</sup> y la aconitasa<sup>(58)</sup>. En este último caso el peroxinitrito desensambla el centro Fe-S que es del tipo [4Fe-4S].



Figura 11. posibles rutas de reacción entre el peroxinitrito y las hemoproteínas. Adaptado de Ferrer-Sueta y Radi, 2009<sup>(148)</sup>.

Por otro lado el peroxinitrito oxida por dos electrones a tiolatos de proteínas, dando como producto ácido sulfénico y nitrito (Ec. 15)<sup>(160)</sup>.

 $RS^- + ONOOH \rightarrow RSOH + NO_2^-$  Ec. 15

Algunas proteínas son particularmente reactivas debido a la presencia de un tiol reactivo **(figura 12)**, cuyo pKa usualmente es bajo<sup>(150)</sup>. Por ejemplo, la peroxirredoxina 5 humana posee una constante aparente de ~10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a pH 7.4 y 25<sup>o</sup>C y un pKa de 5.2<sup>(161, 162)</sup>. Estas

proteínas pueden proteger a la célula de los efectos nocivos del peroxinitrito, por ejemplo en *T. cruzi* un aumento en las peroxirredoxinas aumenta la virulencia del parásito<sup>(22, 163)</sup>.



**Figura 12.** Ciclo catalítico de las peroxirredoxinas (Prx) y glutatión peroxidasas (GPx) en donde el primer paso (a) consiste en la oxidación del tiolato/selenato por ONOOH, luego ocurre la condensación con otra cisteína (b) y finalmente (c) la enzima se reduce por reductores específicos. En el caso de Prx de una cisteína o en seleno-proteínas, la reducción ocurre directamente sobre el ácido sulfénico/selénico. Adaptado de Ferrer-Sueta y col., 2018<sup>(150)</sup>.

#### Dióxido de nitrógeno y nitración proteica

#### •NO2

El  $^{\circ}NO_2$  es un radical cuya formación biológica depende principalmente de: I) el peroxinitrito, II) la oxidación del  $^{\circ}NO$  por O<sub>2</sub> y III) la oxidación del NO<sub>2</sub><sup>-</sup> catalizada por hemoperoxidasas (figura 13).



**Figura 13.** Fuentes biológicas del **\***NO<sub>2</sub>. Adaptado de Signorelli y col. 2011<sup>(164)</sup>.

El  $NO_2$  posee baja solubilidad en agua y alta permeabilidad de membrana (5 cm.s<sup>-1</sup>)<sup>(164)</sup>, por lo que tiene efectos importantes sobre las membranas biológicas.

Es un oxidante moderadamente fuerte ( $E^{o'} \cdot NO_2/NO_2^- = 0.9 V$ ) y participa en reacciones de recombinación con otros radicales, de adición a dobles enlaces, de transferencia de electrones y de abstracción de átomos de hidrógenos en enlaces carbono-hidrógeno como ser compuestos fenólicos<sup>(165)</sup>. Entre las reacciones de recombinación se encuentran las reacciones con radicales lipídicos y proteicos que llevan a la formación de compuestos nitrados.

Un destino de particular interés es la reacción del  $^{\circ}NO_2$  con tioles, por ejemplo con el GSH y la cisteína ( $k = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ y} 3-4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ respectivamente}$ )<sup>(166)</sup>.

#### Nitración de proteínas

La nitración en residuos de proteínas ocurre principalmente en la tirosina dando como



producto 3-nitrotirosina (3-NT). Este proceso ocurre en dos fases: 1) formación del radical tirosilo y 2) reacción con 'NO<sub>2</sub> (figura 14). Varias especies reactivas oxidan por un electrón a la tirosina, con constantes de reacción que varían entre ~10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para el radical lipídico peroxilo  $(LOO^{\bullet})^{(167)}$  y ~10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1(168)</sup> para el CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>. La reacción entre el radical tirosilo y el •NO<sub>2</sub> es muy rápida, del orden de ~10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-</sup> 1(169)

Figura 14. Formación de 3-nitrotirosina (3-NT). Adaptado de Radi, 2012<sup>(170)</sup>.

Es interesante notar que a pH fisiológico, el grupo –OH fenólico de la tirosina se encuentra casi 100% protonado. Sin embargo, la nitración conduce a una disminución de 3 unidades de pH en el valor del pKa aumentando la proporción de tirosina desprotonada a pH celular. Esto puede tener consecuencias a nivel de la estructura y/o función de la proteína ya que se crea una carga negativa donde antes no lo había<sup>(170)</sup>.

Debido a la necesaria presencia de especies reactivas para la formación de 3-NT es que la detección de esta modificación post-traduccional se considera una forma de evidenciar la existencia de estrés nitroxidativo en células e *in vivo*. La presencia de proteínas nitradas se ha detectado en una gran variedad de condiciones patológicas, inclusive en proteínas plasmáticas de ratones y pacientes infectados con *T. cruzi* y durante el envejecimiento<sup>(170-172)</sup>. Asimismo, se ha encontrado 3-NT en tejidos y células sanas indicando que normalmente existe un flujo "basal" de especies nitrantes. Estos niveles normales son muy bajos debido a que existen otros blancos que compiten con la tirosina por las especies reactivas y nitrantes y, por otro lado, por la existencia de especies reductoras que reparan el radical tirosilo, por ejemplo el glutatión (GSH)<sup>(166, 173)</sup>.

Pese a que la formación de 3-NT es un proceso no enzimático mediado por especies reactivas, análisis proteómicos han revelado que la nitración ocurre preferencialmente en algunas proteínas y en residuos específicos de tirosina. Una vez nitrada, la función de la proteína puede no verse afectada o puede perder o ganar función. Un caso típico de inactivación por peroxinitrito es la nitración específica de la tirosina 34 (Tyr34) en la Mn-SOD<sup>(174-176)</sup>, la cual mencionaremos más adelante en el texto.

## Efectos de las especies reactivas sobre patógenos

Como vimos anteriormente y resumo a continuación (figura 15), las especies reactivas derivadas del macrófago son capaces de oxidar proteínas, oxidar lípidos, reaccionar con centros metálicos, nitrar proteínas y oxidar ácidos nucleicos, entre otros, conduciendo a daños en la célula que pueden ser reversibles o irreversibles.



Figura 15. Relación entre las distintas especies reactivas derivadas de macrófagos y sus posibles blancos celulares.

La producción de estas especies y, en particular, del peroxinitrito puede inducir a la apoptosis y necrosis<sup>(177)</sup>, lo que explicaría en parte su actividad microbicida **(figura 16)**.



Figura 16. Mecanismos de muerte celular inducida por peroxinitrito. Tomado de Szabo, Ischiropoulos y Radi, 2007(177).

Aunque muchas veces es difícil asignar un efecto biológico a una especie reactiva en particular (de hecho es probable que actúen en conjunto), la actividad citotóxica de las especies reactivas es evidente cuando se utilizan animales deficientes para una o más de las enzimas involucradas en la generación de oxidantes o, alternativamente, cuando se utilizan cepas de patógenos deficientes o que sobrexpresan enzimas antioxidantes **(tabla 3)**. El ejemplo más dramático fue el modelo desarrollado por Shiloh y col. de un ratón doblemente deficiente de la NOX-2 y la iNOS. Aún en condición libre de microorganismos externos estos ratones morían por infecciones generadas a partir de los microorganismos presentes en la flora normal<sup>(178)</sup>.

Patógeno	Estrategia experimental	Consecuencia	Ref.
Bacterias			
E. coli	Exposición <i>in vitro</i> a •NO y ONOO <sup>-</sup>	Mayor toxicidad del ONOO <sup>-</sup>	(179)
Salmonella thiphimurium	Cepa deficiente en Cu,Zn-SOD	Menor sobrevida en macrófagos y menos virulenta en ratones	(93)
Brucella abortus	Ratones deficientes de la iNOS o NOX-2	Aumenta la infección	(180 <i>,</i> 181)
Mycoplasma pulmonis	Ratones deficientes de la iNOS	Aumenta la infección	(182)
Parásitos			
Cryptosporidium parvum	Inhibidor de la iNOS en animales	Mayor infección	(183)
Leishmania amazoniensis	Infección en ratones	Detección de 3-NT en proteínas de la vacuola fagocítica del macrófago y del parásito	(184)
Leishmania major	Ratones deficientes de iNOS	Mayor infección	(185)
Leishmania donovani	Ratones deficientes de iNOS o NOX-2		(186)
Trypanosoma cruzi	Ratones deficientes de la iNOS o NOX-2	Mayor infección	(28, 29, 36, 37, 43-45).
Hongos			
Candida albicans	Inhibidores de la iNOS y atrapadores de O2 <sup>•-</sup> en macrófagos	Aumenta la infección	(187)

**Tabla 3.** Modulación genética de la producción de oxidantes y/o de enzimas antioxidantes y sus consecuencias *in vitro* o *in vivo*.

## Defensas antioxidantes de T. cruzi

Los microorganismos patógenos son aquellos que resisten o evaden los mecanismos efectores de las células del huésped, logrando esto mediante el uso de una o varias estrategias que incluyen, la evasión, la supresión, la inactivación enzimática, la detoxificación de especies reactivas, el secuestro de hierro y mecanismos de reparación.

En *T. cruzi* se han identificado varios factores que favorecen la supervivencia del parásito y aumentan la virulencia. Entre ellos podemos nombrar a una proteína inhibidora del receptor del complemento C2, la calreticulina, la gp35/50, la gp82, la cruzipaína, la oligopeptidasa B y las transialidasas, entre otros<sup>(136, 188)</sup>.

En esta tesis nos centraremos en estudiar los sistemas antioxidantes de *T. cruzi* y su rol en la virulencia de la infección. Este sistema se compone de moléculas de bajo peso molecular y de enzimas antioxidantes, las cuales serán fundamentales para la detoxificación de las especies reactivas<sup>(136)</sup>. Por ejemplo, se ha encontrado que cepas naturales más virulentas del parásito poseen contenidos más elevados de enzimas antioxidantes, lo que se correlaciona con una menor detección de modificaciones nitroxidativas, presencia de especies reactivas y una mayor virulencia en infecciones *in vivo*<sup>(189, 190)</sup>.

## Tioles de bajo peso molecular

Los tripanosomátidos poseen un tiol de bajo peso molecular distinto al del resto de las especies el cual se denomina tripanotiona  $(T(SH)_2)^{(191)}$ . La molécula es sintetizada por la enzima tripanotiona sintetasa  $(TryS)^{(192)}$  a partir de dos moléculas de GSH y una de espermidina y reemplaza a la primera en su función de reductor intracelular. Al poseer dos tioles con pKa ~7.4 es más reactiva que el GSH pudiendo actuar como reductor de uno o dos electrones<sup>(193)</sup>. La concenración de T(SH)<sub>2</sub> varía según el estadío del parásito, siendo de 0.8-2.1 mM en epimastigotas, 0.5 mM en tripomastigotas y 0.12 mM en amastigotas<sup>(60, 194-196)</sup>. Asimismo estos valores pueden variar según la cepa del parásito.

La T(SH)<sub>2</sub> puede reaccionar directamente con oxidantes o actuar como reductor de otras enzimas involucradas en el sistema antioxidante de *T. cruzi* llamadas triparredoxinas (TXN)(**Figura 17**). La reacción de T(SH)<sub>2</sub> con especies radicalares da como producto un radical tiílo, el cual se combina rápidamente con su tiol vecino y deriva en la producción de un enlace disulfuro y  $O_2^{\bullet-}$ . La T(SH)<sub>2</sub> a su vez, mantiene el pool de ascorbato y de GSH reducido, los cuales serán utilizados por la ascorbato peroxidasa (*Tc*APx-CcP) y las glutatión peroxidasas respectivamente (*Tc*GPx). Luego de reducir a estas enzimas o moléculas la T(SH)<sub>2</sub> se oxida a TS<sub>2</sub> y es vuelta a reducir gracias a una enzima NADPH-dependiente llamada tripanotiona reductasa (TryR)<sup>(197)</sup>.



**Figura 17.** Reacciones dependientes de la T(SH)<sub>2</sub>. (1) Reducción de la TS<sub>2</sub> a expensas de NADPH catalizada por la enzima tripanotiona reductasa (TryR). La TSH<sub>2</sub> es capaz de reducir a la triparredoxina oxidada (TXN-S<sub>2</sub>) (2) y al dehidroascorbato (dhAsc) (3), formando en este último caso ascorbato (Asc) que podrá ser utilizado por la ascorbato peroxidasa (APx-CcP) (4). La TSH<sub>2</sub> reacciona con metilglioxal y forma un intermediario que eventualmente es metabolizado a lactato por las enzimas glioxalasas I y II (Glo I-II) (5). Reduce al glutatión oxidado (GSSG) a glutatión (GSH) (6). Las TXNs actúan como agente reductor de peroxirredoxinas (TXNPx) y glutatión peroxidasa-I (GPx-I) (7), en la síntesis de ribonucleótidos por la enzima ribonucleótido reductasa (RnR) (8) y en la reparación proteica (metionina sulfóxido reductasa, MSR) (9). La reacción con radicales libres (R<sup>+</sup>) conduce a la formación transitoria de un radical tiílo (10) que se combina con su tiol vecino y deriva en la forma estable TS<sub>2</sub> con la concomitante producción de O<sub>2</sub><sup>+</sup> (11). Las proteínas pueden modificarse mediante S-tripanotionilación (12). La T(SH)<sub>2</sub> participa en la detoxificación de drogas (13), en la coordinación de clusters de hierro-azufre (14) y, en presencia de óxido nítrico (\*NO) puede formar un complejo dinitrosil-hierro-tripanotiona o di-nitroso tripanotiona (15). Las enzimas se muestran en verde. *Adaptado de Hugo y col. 2018*<sup>(198)</sup>.

#### Sistemas enzimáticos

*T. cruzi* posee un complejo sistema enzimático antioxidante, capaz de detoxificar la mayoría de las especies reactivas producidas por el macrófago. Posee 5 peroxidasas caracterizadas, dos de ellas son peroxirredoxinas típicas de 2 cisteínas (TXNPx), llamadas *Tc*CPx y *Tc*MPx (isoformas citosólica y mitocondrial respectivamente). Estas enzimas detoxifican H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxinitrito y con menos eficiencia hidroperóxidos orgánicos<sup>(199, 200)</sup>.

Otras dos peroxidasas caracterizadas de *T. cruzi* son homólogas a las GPx de mamíferos llamadas GPx-1 y GPx-2<sup>(201-203)</sup>, aunque poseen una cisteína en vez de una seleno-cisteína en el sitio activo. Ambas enzimas son eficientes en descomponer peróxidos orgánicos pero

no detoxifican  $H_2O_2^{(202)}$ . La GPx-1, aunque puede utilizar GSH como reductor, se ha visto que es más eficiente utilizando al sistema T(SH)<sub>2</sub>/TXN<sup>(201)</sup>.

Un tercer tipo de peroxidasa presente en *T. cruzi* está relacionada a las hemoperoxidasas de plantas dependientes de ascorbato (*Tc*APx-CcP). Aunque no fue encontrada en *T. brucei*, si fue detectada en *T. cruzi* y *L. major*<sup>(204, 205)</sup>. La *Tc*APx-CcP descompone H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero no peróxidos orgánicos y utiliza ascorbato como reductor, molécula que llamativamente puede ser sintetizada por el propio parásito<sup>(206, 207)</sup>. Recientemente se encontró que la *Tc*APx-CcP es una hemoperoxidasa híbrida y también puede utilizar citocromo c (cyt c<sup>2+</sup>) como agente reductor<sup>(208)</sup>.

Aparte de las peroxidasas, *T. cruzi* expresa varias isoformas de SODs, las cuales se encuentran en diferentes compartimentos celulares. Es interesante notar que todas las isoformas presentes en *T. cruzi* son Fe-dependientes, similar a lo que ocurre en plantas. Las isoformas mitocondrial (Fe-SODA) y citosólica/glicosomal (Fe-SODB1) han sido clonadas y caracterizadas<sup>(209, 210)</sup>. En *T. brucei* otras dos isoformas han sido estudiadas, Fe-SODB2 presente en glicosomas y Fe-SODC también mitocondrial<sup>(211, 212)</sup>. La secuencia de la Fe-SODC es similar a la de la Fe-SODA. Análisis filogenéticos construidos a partir de dichas secuencias en tripanosomátidos muestran una divergencia del 100 % entre ambas enzimas, lo cual sugiere que un gen antecesor se duplicó antes de que los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* se separasen<sup>(212)</sup>.

En la siguiente figura se muestran las enzimas antioxidantes en los distintos compartimentos celulares de *T. cruzi* (figura 18).



**Figura 18. Distribución subcelular del sistema enzimático antioxidante de** *T. cruzi***.** El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es metabolizado por la APx-CcP en el retículo endoplasmático, la mitocondria y la membrana plasmática utilizando Asc/Cyt c<sup>2+</sup> como dadores de electrones. Los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) son sustratos de la glutatión peroxidasa II (GPx-II) que utiliza GSH como dador de electrones. La T(SH)<sub>2</sub> reduce el glutatión oxidado (GSSG) mientras que la tripanotiona reductasa (TR) reduce a la tripanotiona oxidada (TS<sub>2</sub>). El O<sub>2</sub>•• es detoxificado en la mitocondria por la Fe-SODA. La peroxirredoxina mitocondrial (MPX) descompone H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o ONOO<sup>-</sup> utilizando TXN-II y T(SH)<sub>2</sub> como sustratos reductores. En el citosol, la CPX es capaz de detoxificar ROOH. La metionina sulfóxido reductasa (Msr) repara las metioninas oxidadas. La T(SH)<sub>2</sub> es sintetizada a partir de dos moléculas de GSH y una espermidina en una reacción catalizada por la tripanotiona sintetasa (TS). *Adaptado de Piacenza y col. (sin publicar)* 

A continuación comentaremos en detalle los mecanismos de acción de la *Tc*APx-CcP y las Fe-SOD de *T. cruzi* ya que serán objeto de estudio de esta tesis.

#### Ascorbato peroxidasa

#### Actividad peroxidasa

La *Tc*APx-CcP fue inicialmente descrita como una hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (Km = 192 mM; kcat/Km  $\sim 10^6 M^{-1}s^{-1}$ )<sup>(204)</sup>.

En las hemoperoxidasas el ciclo catalítico comienza con la formación del compuesto I (figura 19), que corresponde a la reducción por dos electrones del  $H_2O_2$  a expensas de la formación de un oxoferrilo (Fe<sup>IV</sup>=O) y un radical catiónico centrado en la porfirina en la enzima. Luego, el compuesto I es capaz de oxidar a una gran variedad de sustratos ya sea por uno o dos electrones. En la MPO el potencial de reducción por uno o dos electrones del compuesto I es de 1.35 V y 1.16 V respectivamente, por lo que es un oxidante muy fuerte. Sustratos que pueden donar dos electrones al compuesto I incluyen al Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> y  $H_2O_2$ . Alternativamente, el compuesto I puede reaccionar por un electrón con distintos reductores celulares (RH) y producir el compuesto II, que al reaccionar nuevamente con un reductor forma la enzima nativa (cuyo metal se encuentra en el estado Fe<sup>III</sup>)<sup>(51)</sup>. En el caso de la TcAPx-CcP la función de reductor del compuesto I y II la cumple el ascorbato. El ascorbato se oxida a dehidroascorbato, el cual es reducido nuevamente por la T(SH)<sub>2</sub><sup>(204,</sup> <sup>213)</sup>. En este sentido, cabe mencionar que hasta la fecha no se ha identificado una actividad de-hidro ascorbato reductasa en T. cruzi<sup>(214)</sup>, sin embargo, si se ha descrito la síntesis de novo, lo que compensaría su incapacidad de incorporarlo del medio<sup>(206)</sup>. La TcAPx-CcP pertenece al grupo de las hemoperoxidasas de clase I, que comprende a las citocromo c peroxidasas (CcP), las ascorbato peroxidasas, las catalasa-peroxidasas y las peroxidasas híbridas, las cuales pueden utilizar tanto ascorbato como citocromo c (cyt c<sup>+2</sup>) como reductor (APx-CcP)<sup>(215)</sup>. La mayoría de las APx-CcP poseen un triptofano distal y uno proximal que le confiere la actividad CcP. Leishmania major, por ejemplo, posee una APx-CcP<sup>(216)</sup> y se demostró que la mutación W208F genera una enzima sin actividad CcP pero que retiene actividad APx<sup>(205)</sup>. El mecanismo dilucidado involucra al triptófano 208 cercano al hemo, el cual rápidamente reduce al radical centrado en la porfirina del compuesto I dando lugar a un radical catiónico en dicho aminoácido y formando lo que se denomina el compuesto tipo I (figura 19). Este compuesto es finalmente reducido por ascorbato o cyt c<sup>+2</sup> dando lugar a la enzima nativa<sup>(205)</sup>. *Tc*APx comparte una homología siginificativa con la LmAPx-CcP (62 % identidad y 86 % similitud)<sup>(216)</sup> y estudios filogenéticos la clasificaron como miembro de las hemoperoxidasas híbridas de tipo A<sup>(215, 217)</sup>. Por esta razón es de interés estudiar si esta enzima es capaz de funcionar como peroxidasa híbrida, así como lo hace la LmAPx-CcP. En su tesis de doctorado, Martín Hugo detectó, mediante la observación de los espectros de absorción, que la enzima no formaba un compuesto I típico



sino un compuesto tipo I luego de la reacción con  $H_2O_2^{(208)}$ . En este caso el triptofano candidato а reducir a la porfirina sería el Adicionalmente W233. demostró que la TcAPx-CcP era capaz de catalizar la oxidación de cyt  $c^{2+}$  por  $H_2O_2$ , mostrando una eficiencia catalítica aún mayor que con ascorbato (kcat/Km = 2.1 x $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y un Km un orden de magnitud menor (Km = 23.5  $\mu$ M)<sup>(208)</sup>. Por tanto, la TcAPx-CcP es una hemoperoxidasa híbrida.

**Figura 19.** Mecanismo catalítico de las hemoperoxidasas. Las APx siguen la ruta de reacción inferior utilizando ascorbato como reductor (RH). Las CcP siguen la ruta superior, en donde se forma un radical centrado en un triptófano cercano al hemo y luego utilizan cyt c<sup>2+</sup> como reductor.

#### Localización subcelular y rol en la virulencia

El primer trabajo que caracterizó a la *Tc*APx-CcP de *T. cruzi* menciona que la enzima se encuentra limitada al retículo endoplasmático<sup>(204)</sup>. Sin embargo, la nueva actividad CcP en la *Tc*APx-CcP, y el hecho que su homóloga en *L. major* se encuentra en la membrana mitocondrial interna orientada hacia el espacio intermembrana<sup>(218)</sup>, condujo a Hugo y col. a re-plantearse su localización y efectivamente la lograron detectar en la membrana plasmática y asociada a la membrana mitocondrial<sup>(208)</sup>. Esto último abre nuevas posibilidades en cuanto al rol de la enzima en la detoxificación de peróxidos.

En este sentido, se ha visto que epimastigotes sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP son más resistentes a la toxicidad por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la cepa WT<sup>(204)</sup> mientras que parásitos knockout son más sensibles<sup>(219)</sup>. A su vez, la expresión de la *Tc*APx-CcP aumenta luego de la exposición del parásito a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se encuentra incrementada en algunas cepas aisladas resistentes a la droga benznidazol<sup>(220)</sup>. Sin embargo, no se observó una correlación entre el contenido de *Tc*APx-CcP de distintas cepas de *T. cruzi* y los niveles de parasitemia en modelos animales de infección<sup>(189)</sup>. Asimismo, tampoco se observó que la *Tc*APx-CcP sea un factor de virulencia utilizando parásitos knockout de la enzima en un modelo murino de la fase crónica de la enfermedad, aunque si se detectó una menor cantidad de parásitos en la fase aguda<sup>(219)</sup>. Se desconoce si esta enzima es capaz de descomponer peroxinitrito *in vitro*. Epimastigotas sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP son igualmente susceptibles al peroxinitrito que la cepa WT<sup>(163)</sup>. Sin embargo, dado que en las formas infectivas la enzima se encuentra en la membrana plasmática, no se puede descartar su posible rol en la detoxificación de dicho oxidante durante la infección a células de mamífero.

#### Superoxido dismutasas

#### Reacción de dismutación

Las SODs son metaloenzimas de Fe, Mn, Cu/Zn o Ni que catalizan la dismutación del  $O_2^{\bullet}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$  en una reacción de dos pasos **(Ec. 16 y 17)**:

$$O_2^{\bullet-} + M^{n+}SOD \to O_2 + M^{(n-1)+}SOD$$
 Ec. 16

 $O_2^{\bullet-} + M^{(n-1)+}SOD + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + M^{n+}SOD$  Ec. 17

En este mecanismo, el complejo metálico (M<sup>n+</sup>) participa tanto en la reducción como en la oxidación del  $O_2^{\bullet-}$ , por tanto su potencial de reducción debe situarse entre -0.16 V y 0.89 V (E<sup>o</sup>' del par  $O_2/O_2^{\bullet-}$  y  $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$  respectivamente), de lo contrario no podría actuar como SOD. Las SODs tienen la particularidad de poseer un potencial de reducción finamente regulado de forma que se sitúa entre los valores antedichos, 0.26 V para la Cu/Zn-SOD, 0.31 V para la Mn-SOD y 0.23-0.29 V para la Fe-SOD. El cianuro, un inhibidor de la Cu/Zn-SOD, disminuye su E<sup>o</sup>' a -0.44 V imposibilitando su función de SOD<sup>(63)</sup>.

En general todas las isoformas de las SODs se encuentran en el orden de micro molar en la célula (4-40  $\mu$ M Cu/Zn-SOD y 1-30  $\mu$ M Mn-SOD)<sup>(72, 175, 221)</sup>, sin embargo las constantes de reacción varían en función del metal, siendo las isoformas de Fe las más lentas (~10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para las Cu/Zn-SOD y ~10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para las Fe-SOD)<sup>(97, 222)</sup>. Dado que la reacción del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con el •NO es uno o dos órdenes más rápida, la concentración y localización de la SOD en el sitio de formación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es de vital importancia.

#### Localización subcelular

Las SODs fueron descritas por primera vez en 1969 por McCord y Fridovich purificándola a partir de glóbulos rojos<sup>(87)</sup>. Con el tiempo, no sólo se demostró y cuantificó su presencia en diferentes tejidos de mamíferos<sup>(223)</sup> sino que se encontró que era esencial para la vida aerobia<sup>(88, 89)</sup>. La identidad del metal y la localización de las SODs varían en las diferentes especies. En mamíferos, existe una Mn-SOD en la mitocondria, una Cu/Zn-SOD en el citosol y en el espacio intermembrana mitocondrial y una Cu/Zn-SOD extracelular. En *E. coli*, como en muchas otras bacterias, existen dos SODs citoplasmáticas (una MnSOD y una FeSOD)<sup>(224, 225)</sup> y, por otro lado, una Cu/Zn-SOD en el periplasma<sup>(226)</sup> la cual se ha sugerido que posee un rol importante en la defensa contra el O2<sup>•-</sup> proveniente del exterior<sup>(90-93)</sup>. En general, las plantas poseen Mn-SOD en su mitocondria y peroxisomas y Fe-SOD en sus cloroplastos. Los tripanosomátidos, por su parte, poseen sólo la isoforma dependiente de Fe en varios compartimentos subcelulares (Fe-SODA y Fe-SODC en la mitocondria, Fe-SODB1 en el citosol y glicosomas y Fe-SODB2 sólo en glicosomas<sup>(197)</sup>).

En *Trypanosoma cruzi*, las principales fuentes de  $O_2^{\bullet-}$  a las que se puede ver expuesto el parásito son la NOX-2 presente en células fagocíticas, la mitocondria o el metabolismo de xenobióticos. En el caso de la mitocondria, se ha visto que diferentes agentes son capaces de inducir un aumento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , como ser el suero humano fresco, el \*NO o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En los tres casos un aumento de la expresión de la Fe-SODA disminuye la concentración del  $O_2^{\bullet-}$  y protege de sus efectos celulares, por ejemplo, de la apoptosis<sup>(60,</sup>

<sup>136, 227)</sup>. La Fe-SODB1 del parásito es la única isoforma presente en el citosol por lo que es una excelente candidata a defender al parásito del  $O_2^{\bullet}$  proveniente del exterior. Este rol aún no ha sido estudiado y será objeto de estudio de esta tesis.

#### Estructura y relaciones evolutivas

2.4 billones de años atrás ocurrió la transición entre la antigua atmósfera reductora y la actual oxidante. La necesidad de sistemas de protección contra los efectos secundarios nocivos del O<sub>2</sub> generó una presión evolutiva que condujo a la aparición muy temprana de una SOD ancestral. Este hecho es tan antiguo que actualmente la SOD se encuentra en todos los órdenes de la vida indicando que su aparición ocurrió antes de la separación entre el dominio bacteria del archaea. Sin embargo, no todas las isoformas de la SOD evolucionaron a partir de una misma proteína, sino que existen tres familias. La versión más antigua de la SOD utilizaba Fe, el cual abundaba en el ambiente antiguo reductor. Luego se comenzó a preferir el Mn, el cual poseía menos efectos tóxicos que el Fe en presencia de O<sub>2</sub>. Por tanto, la primer familia de las SODs engloba a las Fe-SODs y Mn-SODs. Sus estructuras son tan homólogas<sup>(228)</sup> que algunos organismos poseen SODs con capacidad



de unir tanto Fe como Mn. A estas SODs se les denomina cambialísticas<sup>(229)</sup>. Sin embargo, la mayoría de las Mn-SOD no pueden utilizar Fe y viceversa sin alterar su función<sup>(230, 231)</sup>. El sitio activo de las Fe-SODs y Mn-SODs se encuentra altamente conservado (figura 20), el Fe está coordinado a tres histidinas y un aspartato, así como a una molécula de agua del solvente<sup>(232)</sup>. El sitio activo también contiene un residuo de tirosina (Tyr34), se el cual encuentra conservado en todas las Fe-SODs y Mn-SODs y posee un rol importante en la actividad<sup>(233)</sup>.

**Figura 20.** Estructuras superpuestas de la Fe-SOD y Mn-SOD de *E. coli*. Sólo un monómero se muestra y se resaltan el metal, los aminoácidos que lo coordinan, una glutamina conservada y la Tyr34. *Adaptado de Miller, 2012*<sup>(230)</sup>.

Una familia distinta es la dependiente de níquel, la cual fue descrita por primera vez en hongos<sup>(234)</sup>. Aunque se ha encontrado también en cianobacterias, hasta el momento no se ha descrito en bacterias gram-positivas, archaea o eucariotas, salvo un caso de un alga unicelular. Esto implica que seguramente, las Ni-SODs hayan evolucionado de forma independiente a las Fe-SODs o Mn-SODs y más adelante en la historia<sup>(230)</sup>. El sitio activo de las Ni-SODs se encuentra la porción N-terminal e involucra a nueve aminoácidos.

La última y tercer familia de SODs corresponde a las Cu/Zn-SODs. Estas enzimas se encuentran presentes en muchas especies, por ejemplo en el periplasma de varias bacterias gram-negativas patogénicas. También se encuentra presente en plantas, animales y hongos, aunque extrañamente está ausente en protistas. Un caso particularmente interesante es la SODC de *M. tuberculosis*. Esta enzima posee una gran homología con otras Cu/Zn-SODs pero sin embargo no contiene Zn, lo cual podría conferirle una ventaja al patógeno ya que no dependería de la obtención de dicho metal desde el huésped para expresar la enzima activa<sup>(235)</sup>.

A continuación se adjunta dos imágenes que muestran las diferencias estructurales y evolutivas de las tres familias (figura 21 y 22).



Figura 21. Estructuras de las SODs (segunda fila es la estructura rotada 90°). Las Ni-SOD son homohexámeros de cuatro hélices-alfa, cada uno de los monómeros unen un Ni en su extremo Nterminal. Las Cu/Zn-SOD son dímeros, o dímero de dímeros, y poseen un barril beta, una corta hélice

alfa, un Cu y un Zn en cada monómero. Las Fe-SODs o Mn-SODs también se pueden encontrar como dímeros o tetrámeros. Poseen una hoja beta, varias hélices alfa y un ion de Fe o Mn. Adaptado de Miller, 2012<sup>(230)</sup>.



Figura 22. Distribución de las SODs en los distintos dominios de la vida. Naranja: Fe-SODs, magenta: Mn-SODs, azul: Cu/Zn-SODs y verde: Ni-SODs. Los estados cuaternarios de cada SOD se indican en las células pero no en el árbol. Adaptado de miller 2012.
#### Nitración

Se han descrito en las SODs varias modificaciones post-traduccionales que pueden modificar la actividad de la enzima y participar en mecanismos fisiológicos de regulación y/o procesos patológicos. Ejemplos de estas modificaciones son la fosforilación, la acetilación y la nitración.

La nitración, como mencionamos anteriormente, es un fenómeno oxidativo que requiere de la presencia simultánea de un radical proteico y 'NO<sub>2</sub>. Muy poco tiempo después de que se postulara que el peroxinitrito era una molécula potencialmente tóxica se detectó la presencia de 3-NT en SODs expuestas a este compuesto<sup>(236)</sup>. Esta modificación fue posteriormente estudiada en profundidad para la Mn-SOD mitocondrial, donde se encontró que esta enzima se inactiva por peroxinitrito debido a la nitración específica de la tirosina 34<sup>(174-176)</sup>. La Tyr34 se encuentra muy cerca del sitio activo (figura 23) y la nitración de este residuo conduce al bloqueo del canal de acceso del sustrato al sitio activo. A esto último, se suma el efecto de repulsión del sustrato que se crea por la ganancia de una carga negativa en la 3-NT.



**Figura 23.** Vista esquemática del canal de entrada del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a la Mn-SOD (A) y de cómo se bloquea el acceso con la presencia de 3-NT en la Tyr34 (B). Adaptado de Radi, 2012<sup>(170)</sup>.

El mecanismo de nitración que se propone implica la formación de un intermediario oxometálico (Ec. 18), que sería la especie oxidante de la tirosina ( $k \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , Ec. 19). Luego la reacción del radical tirosilo con el  $^{\circ}\text{NO}_2$  es muy rápida produciendo el aminoácido nitrado ( $k \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , Ec. 20).

	$Mn^{3-}$	+SOD	$+ 0N00^{-}$	$\rightarrow 0 =$	$Mn^{4+}SOD +$	• • <i>NO</i> <sub>2</sub>	Ec. 18
--	-----------	------	--------------	-------------------	----------------	----------------------------	--------

$$Tyr34 + 0 = Mn^{4+} \rightarrow {}^{\bullet}Tyr34 + Mn^{3+} + 0H^{-}$$
 Ec. 19

$$^{\bullet}Tyr34 + ^{\bullet}NO_2 \rightarrow NO_2Tyr34$$
 Ec. 20

#### Modulación de la expresión de enzimas antioxidantes

Para estudiar el rol *in vivo* del sistema antioxidante la estrategia ha sido manipular genéticamente los parásitos para específicamente aumentar o disminuir la expresión de determinada enzima **(tabla 4)**. En el caso de *T. cruzi*, los experimentos se han centrado en su gran mayoría en la sobrexpresión enzimática debido a que obtener cepas knockout es muy difícil (la eficiencia de recombinación homóloga es muy baja en *T. cruzi* y está limitada a un solo alelo por marcador de selección)<sup>(237)</sup> y no se puede emplear ARN de interferencia (ARNi) ya que *T. cruzi* no posee la maquinaria necesaria para procesarlos<sup>(238)</sup>. Recientemente, se han obtenido resultados exitosos utilizando el sistema CRISPR-Cas9 y sin duda es una herramienta que resultará muy útil en el futuro<sup>(239-241)</sup>.

Enzima	Especie	Método	Fenotipo	Ref.	
Metabolismo de la T(SH)2					
TryS	T. brucei	ARNi	Alteración en el crecimiento y viabilidad. Mayor sensibilidad a H2O2 y t-butil-hidroperóxido	(242, 243)	
TryR	T. brucei	Expresión variable, dependiente de tetraciclina	Alteración en el crecimiento, mayor sensibilidad al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e incapacidad de establecer la infección <i>in vivo</i> en ausencia de tetraciclina	(244)	
TryR	T. cruzi	Sobrexpresión	Susceptibilidad inalterada a H2O2 y nifurtimox	(245)	
Triparredoxinas y peroxidasas					
TXN-1	T. brucei	ARNi	Alteración en el crecimiento y viabilidad. Mayor sensibilidad a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(246, 247)	
TXN-2	T. brucei	ARNi	Sin alteración	(246)	
СРХ	T. cruzi	Sobrexpresión	Mayor resistencia a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , t-butil- hidroperóxido y peroxinitrito. Mayor infectividad <i>in vitro e in vivo.</i>	(22, 163, 248, 249)	
МРХ	T. cruzi	Sobrexpresión	Mayor resistencia a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , t-butil- hidroperóxido y peroxinitrito. Mayor infectividad <i>in vitro.</i>	(163, 248, 249)	
APX-CcP	T. cruzi	Sobrexpresión	Mayor resistencia a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(204)	
АРХ-СсР	T. cruzi	Deleción génica	Si bien presentan un menor porcentaje de infección en células y mayor sensibilidad a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , <i>in vivo</i> logran establecer la infección	(219)	

Tabla 4. Algunos ejemplos de modificaciones genéticas del sistema antioxidante en tripanosomátidos.

33

Enzima	Especie	Método	Fenotipo	Ref.
GPx-1	T. cruzi	Sobrexpresión	Mayor resistencia a H2O2, t-butil- hidroperóxido	(201)
Superóxido dismutasa	S			
Fe-SODA (Mitocondria)	T. cruzi	Sobrexpresión	Resistencia a la apoptosis mediada por complemento, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y <sup>•</sup> NO. Mayor infección en cardiomiocitos inmunoestimulados.	(60, 227)
Fe-SODA (Mitocondria)	T. brucei	ARNi	No hay efecto en el crecimiento. Aumento en la sensibilidad a paraquat	(211)
Fe-SODB1 (Citosol/glicosomas)	T. cruzi	Sobrexpresión	Aumento en la sensibilidad a benznidazol y violeta de genciana	(250)
Fe-SODB1 (Citosol/glicosomas)	T. brucei	Deleción génica	Aumento en la sensibilidad a nifurtimox y benznidazol	(251)
Fe-SODB1 / Fe- SODB2 (Citosol/glicosomas)	T. brucei	ARNi	Alteración en el crecimiento y viabilidad	(211)
Fe-SODB2 (glicosomas)	T. brucei	Deleción génica	Sin alteración	(251)

# Objetivos

En este trabajo estudiaremos aspectos bioquímicos-mecanísticos de tres enzimas del sistema antioxidante de *Trypanosoma cruzi* expuestas a especies reactivas de relevancia fisiológica. Asimismo evaluaremos su contribución a la invasión y proliferación en macrófagos, así como su rol en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas. Los resultados obtenidos nos permitirán contribuir al conocimiento de las reacciones redox en proteínas y evaluar si dichas enzimas contribuyen a la virulencia del parásito.

En este sentido nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar las modificaciones nitroxidativas en la Fe-SODA (isoforma mitocondrial) y Fe-SODB1 (de ahora en más Fe-SODB, isoforma citosólica) expuestas a peroxinitrito (Capítulo 1).
- 2- Evaluar la contribución de la Fe-SODA y Fe-SODB en la defensa contra el estrés oxidativo generado por macrófagos *in vitro* y de la Fe-SODB en la virulencia durante la infección aguda *in vivo*. Evaluar la producción y difusión a través de la membrana del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durante la fagocitosis (Capítulo 2).
- 3- Dilucidar el mecanismo de reacción de la *Tc*APx-CcP con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de cyt c<sup>2+</sup> y su rol durante la infección a macrófagos e *in vivo* utilizando un modelo murino de la etapa aguda de la enfermedad (Capítulo 3).

# **CAPÍTULO 1**

Estudio de las modificaciones nitroxidativas en la Fe-SODA y Fe-SODB expuestas a peroxinitrito

# Resumen

Durante la fagocitosis de *T. cruzi* por macrófagos previamente inmunoestimulados se producen peroxinitrito, el cual es capaz de difundir hacia el parásito internalizado y modificar una gran variedad de biomoléculas. Estudios anteriores en la Mn-SOD han mostrado que esta enzima es altamente susceptible a la inactivación por peroxinitrito debido a la nitración en la Tyr34 cercana al sitio activo. *T. cruzi* contiene exclusivamente Fe-SODs las cuales se encuentran relacionadas filogenética y estructuralmente a las Mn-SODs. Estas enzimas se encuentran en diferentes compartimentos sub-celulares demostrando la importancia en la detoxificación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Los efectos del peroxinitrito sobre las Fe-SODs de *T. cruzi* aún no se conocen y serán objeto de estudio de este capítulo.

### Principales resultados obtenidos

- El peroxinitrito reacciona directamente con las isoformas mitocondrial y citosólica (Fe-SODA y Fe-SODB respectivamente) con constantes de reacción de 4.6  $\pm$  0.2 x 10<sup>4</sup> y 4.3  $\pm$  0.4 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a pH 7.4 y 37°C respectivamente.
- Ambas enzimas se inactivan y nitran de forma dosis dependiente con peroxinitrito. La susceptibilidad de la Fe-SODA hacia el peroxinitrito es similar a las ya reportadas para las Mn-SODs y Fe-SODs de *E. coli* y para la Mn-SOD de mamíferos. Sin embargo, la Fe-SODB resultó ser excepcionalmente resistente.
- La inactivación se debe a la nitración sitio específica en la Tyr35 cercana al Fe del sitio activo.
- Se cristalizó y resolvió la estructura de la Fe-SODA. Se encontraron diferencias estructurales entre la Fe-SODA y Fe-SODB que incluyen varios triptófanos y cisteínas.
- La alquilación de los tioles de la Fe-SODB revierte el fenotipo observado volviéndose susceptible al peroxinitrito. En particular, la mutación C83S (cisteína ausente en la Fe-SODA) aumenta la sensibilidad de la Fe-SODB. Se encontró que la Cys83 presente en la Fe-SODB actúa como dador de electrones y repara, mediante un mecanismo de transferencia de electrones intra-molecula (IET), el radical tirosilo formado en la Tyr35, previniendo de esta manera la nitración e inactivación de la enzima.
- La T(SH)<sub>2</sub> es capaz de reducir al radical Cys83-S<sup>•</sup> permitiendo que la Fe-SODB pueda reaccionar con más de una molécula de ONOO<sup>-</sup> sin ser inactivada *in vivo*.
- Se detectó la nitración y oxidación de la Fe-SODA en parásitos expuestos a fuentes exógenas y endógenas de peroxinitrito. No se observaron cambios en la Fe-SODB en estas condiciones.
- Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que ambas enzimas podrían tener diferentes roles (señalización o defensa) durante la infección a células de mamíferos.

# Materiales y métodos

#### Reactivos

La *N*-etilmaleimida (NEM), ácido dietilen-triamino-pentanoico, ácido 5,5-ditiobis-(2nitrobenzoico) (DTNB), dióxido de manganeso, medio de cultivo "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM), LPS, geneticina (G418), L-cisteína metil ester, 4-(2-piridilazo)resorcinol y fenil-*N*-butil nitrona (PBN) se adquirieron de Sigma. El dador de •NO 1-hidroxi-2-oxo-3-(*N*-etil-2-aminoetil)-3-etil-1-triazeno (NOC-12) se compró a Dojindo. El IFN- $\gamma$ recombinante murino fue de Calbiochem. El peroxinitrito fue sintetizado en el laboratorio a partir de nitrito de sodio y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones ácidas y se cuantificado como se describió previamente. El exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se removió con MnO<sub>2</sub> y la contaminación con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> fue siempre menor al 20 %<sup>(139)</sup>. La concentración de peroxinitrito se determinó espectrofotométricamente a 302 nm ( $\epsilon$  = 1670 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)<sup>(252)</sup>. El *spin trap* 5,5-dimetil-1pirrolina-N-óxido (DMPO) y el anticuerpo anti-DMPO fueron amablemente cedidos por el Dr. Ronald Maison (NIEHS, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

## Expresión, purificación y mutación sitio-dirigida en las Fe-SODA y Fe-SODB de *T. cruzi*

Los genes de las Fe-SODs fueron amplificados a partir de ADN genómico de T. cruzi (cepa Fe-SODA, 5'-CL-Brener) usando los siguientes primers: 5'-GGATCCGCCCGGCCGAGTTGCCCAA-3' (forward) y Fe-SODB, 5'-GGAAGCTTTATTTATTGCCTGCGCATG-3' (reverse); 5'-GGGGATCCATGGTCTTCAGCATTCCTCC-3' (forward) y GGAAGCTTCGTGGGTCAAAGTTGTCG -3' (reverse). Se señalan los sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y HindIII. El producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) purificado (kit de extracción de gel BIORON) se ligó en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se transformó en bacterias electrocompetentes de E. coli XL1 blue la cual se utilizó como cepa de almacenamiento. Los genes amplificados de la Fe-SODA (sin el péptido señal de translocación a la mitocondria) y la Fe-SODB se clonaron en el vector pQE-30 (Qiagen) entre los sitios BamHI y HindIII y se transformaron en bacterias de E. coli M15 (pREP4). Estas células se cultivaron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (100 μg/mL) y kanamicina (50 μg/mL). La expresión se indujo utilizando el compuesto isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG, 0.8 mM) y cuando el cultivo alcanzó una A<sub>600</sub> = 0.6 se bajó la temperatura a 22°C durante toda la noche. La purificación se realizó en una columna de 5 mL HiTrap (Amersham Biosciencies) cargada con niquel y equilibrada con el buffer de unión (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.6, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM) a un flujo de 3 mL/min. La elución se realizó en gradiente linear de imidazol (10-500 mM) sobre la misma base del buffer de unión. El imidazol se removió mediante gel filtración utilizando las columnas HiTrap desalting de Amersham Biosciences y buffer fosfato de sodio (50 mM, pH 7.4). La pureza se evaluó mediante SDS-PAGE y la concentración de proteína utilizando el método de Bradford<sup>(253)</sup>. El peso molecular de las proteínas purificadas se evaluó mediante cromatografía de gel filtración utilizando una columna Superdex-200 (GE Healthcare) calibrada con los siguientes estándares: 13700, 29000, 43000 y 75000 Da (GE Healthcare). El contenido de Fe se midió utilizando el reactivo 4-piridilazo-resorcinol<sup>(254)</sup>. La mutagénesis sito-dirigida en la Fe-SODB-C159S se realizó mediante PCR del ADN plasmídico previamente

construido (pQE30-SODB) con 1.25 U de *Pfu* Turbo DNA polimerasa (Fermentas) usando los siguientes primers: 5'- ACTTGAAGCCTCTCCTTACAAGCGATGTATGGGAG-3' (forward) y 5'-CTCCCATACATCGCTTGTAAGGAGAGAGGCTTCAAGT-3' (reverse). La PCR se realizó con una temperatura de unión de 55°C (16 ciclos) y una temperatura de extensión de 68°C (8 min). Luego de la PCR, el ADN mutado se seleccionó con DpnI (Biolabs), la cual degrada el ADN metilado parental. La secuencia se corroboró en la plataforma de secuenciación del Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay. Los mutantes Fe-SODB-C83S y N187D/K189E se compraron a GenScript. Las proteínas se expresaron y purificaron como se describió anteriormente.

#### Determinación de la constante con O2<sup>•-</sup>

La actividad SOD de las proteínas recombinantes se cuantificó midiendo la disminución de la velocidad de reducción del cyt  $c^{2+}$  (20 µM) dependiente de  $O_2^{\bullet-}$  a 550 nm utilizando xantina (X, 50 µM) y xantina oxidasa (XO, cantidad suficiente para una pendiente inicial de 0.025 min<sup>-1</sup>) como fuente de  $O_2^{\bullet-(87)}$ . Las constantes de reacción se determinaron mediante el método cinético de competencia descrito previamente. La reducción del cyt  $c^{2+}$  (20 µM) se monitoreó a 550 nm y 37°C en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.8 en presencia o ausencia de Fe-SODA o Fe-SODB (0-40 nM). Las velocidades de reducción del cyt  $c^{2+}$  en ausencia (V<sub>o</sub>) y presencia de Fe-SOD (V<sub>SOD</sub>) se utilizaron para calcular las fracciones de inhibición (FI = (V<sub>o</sub>- V<sub>SOD</sub>)/ V<sub>o</sub>). Sabiendo que la constante de velocidad entre el  $O_2^{\bullet-}$  y el cyt  $c^{2+}$  a pH 7.8 previamente reportada es de  $k = 2.6 \pm 0.1 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> se calculó la constante de velocidad entre el  $O_2^{\bullet-}$  y las Fe-SODs siguiendo la siguiente ecuación:  $k_{SOD} = k_{cyt c2+} \times ([cyt c^{2+}]/[Fe-SOD]_{50})$ . La [Fe-SOD]<sub>50</sub> (concentración de SOD que causa una FI de 0.5) se obtuvo a partir de la gráfica FI vs. [Fe-SOD], cuya curva se ajusta a una hipérbola rectangular<sup>(255)</sup>.

#### Determinación de la constante con peroxinitrito

La cinética de descomposición del peroxinitrito (10 y 17  $\mu$ M para la Fe-SODA y Fe-SODB respectivamente) en presencia o ausencia de Fe-SODs (0-15  $\mu$ M) se monitoreó a 302 nm ( $\varepsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en un espectrofotómetro de flujo detenido (SX20, Applied Photophysics) el cual posee un tiempo de mezcla de < 2 ms. Se utilizó para determinar la constante de reacción el método de velocidades iniciales<sup>(256)</sup>, en donde los primeros 0-0.15 s de descomposición se ajustaron a una curva lineal y las velocidades iniciales se obtuvieron al dividir la pendiente de dicha curva por el coeficiente de extinción molar del peroxinitrito multiplicado por 1.25. Este factor tiene en cuenta que a pH 7.4 un 20% del peroxinitrito se encuentra protonado y no absorbe luz a 302 nm. Las constantes de segundo orden de reacción ( $k_2$ ) se calcularon como V<sub>0</sub> = ( $k_1 + k_2 \times$  [Fe-SOD]<sub>0</sub>) x [peroxinitrito]<sub>0</sub>, donde  $k_1$  es la constante de descomposición del peroxinitrito en ausencia de Fe-SOD<sup>(256)</sup>. Los valores reportados son el promedio de al menos siete determinaciones. La temperatura se mantuvo en 37<sup>o</sup>C y el pH a 7.4.

#### Medida del contenido y alquilación de tioles proteicos

Los tioles proteicos se cuantificaron usando el ensayo del DTNB<sup>(257)</sup>. Los tioles se redujeron previamente incubando la enzima con ditiotreitol (DTT, 1mM) por 30 min a temperatura ambiente. La alquilación de las Fe-SODs (200 µM) se realizó mezclando las enzimas con

NEM (10 mM) por 2 h en buffer fosfato de sodio (50 mM, pH 7.4) a 4°C. El exceso de DTT y NEM se removió inmediatamente luego de la incubación usando las columnas HiTrap desalting de Amersham Biosciences como se describió previamente<sup>(199)</sup>.

#### Tratamiento de las Fe-SODs con peroxinitrito

El peroxinitrito (0-2000  $\mu$ M) se agregó a las enzimas purificadas (8  $\mu$ M, buffer fosfato 200 mM, pH 5.8-8.0) en una dosis única en bolo utilizando vortex por 10 s. La actividad SOD se midió como se describió anteriormente. La adición de peroxinitrito se realizó en presencia o ausencia de GSH (10 mM), ácido úrico (100  $\mu$ M), L-cisteina metil éster (8  $\mu$ M), bicarbonato (25 mM), PBN (50 mM) o DMPO (100 mM).

#### Western blots

Luego del tratamiento, las proteínas se separaron en un gel con SDS de 15 %, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizó el bloqueo en buffer fosfato salino (PBS; NaCl, 137 mM; KCl, 2.7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM) conteniendo 5 % m/v de leche en polvo. Las membranas se incubaron con el anticuerpo policional de conejo anti-nitrotirosina (1/2000, producido en el laboratorio<sup>(258)</sup>) o con el anticuerpo policional de conejo anti-T. cruzi Fe-SODA o anti-T. cruzi Fe-SODB (1/5000, producido en el Instituto Pasteur<sup>(259)</sup>). Las diluciones de los anticuerpos se realizaron en PBS y Tween 20 (0.1 % v/v) y la incubación fue por 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Luego de tres lavados las membranas se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos anti-IgG de conejo (ya sea IR Dye-800 e IR Dye-680 de Li-COR Biosciences o el conjugado a peroxidasa de Calbiochem). La dilución utilizada fue de 1/15000 en PBS y Tween 20 (0.1 % v/v). Luego de tres lavados las membranas se visualizaron en un sistema de detección de fluorescencia en el infrarojo (Odyssey, Li-COR Biosciencies) o mediante el uso de placas fotográficas utilizando el kit Immun-Star de Bio-Rad. En los experimentos de atrapamiento de radicales (del inglés: immune-spin trapping), luego de la exposición de la Fe-SODB (50  $\mu$ M) a peroxinitrito (5-20  $\mu$ M) en presencia o ausencia de DMPO (100 mM), las muestras se analizaron por Western blot buscando los aductos DMPO-nitrona-proteína con el anticuerpo policional de conejo anti-DMPO-nitrona (1/2000 en PBS; Tween 20 0.1 % v/v y albúmina bovina, BSA, 4 % v/v) como se describió previamente<sup>(260)</sup>. Las proteínas reactivas se detectaron con el sistema de visualización en el infrarojo que se mencionó anteriormente.

## Estudios de EPR

Los espectros de resonancia paramagnética electrónica (del inglés: electron paramagnetic resonance, EPR) se registraron a temperatura ambiente ( $25^{\circ}$ C) en el equipo Bruker EMX. La Fe-SODB nativa o la Fe-SODB-C83S (2 mM) se incubaron con el atrapador de radicales PBN (50 mM) y se expusieron a peroxinitrito (500  $\mu$ M). En algunos casos se adicionó T(SH)<sub>2</sub> (0-1 mM, cedida amablemente por la Dra. Luise Krauth-Siegel) previo a la exposición. Inmediatamente después de la adición del oxidante, las muestras se transfirieron a una celda plana (200  $\mu$ L), y se realizaron los registros en el equipo (15 adquisiciones). En algunos casos, los aductos entre la Fe-SODB y el PBN fueron posteriormente digeridos con Pronasa (20 mg/mL) durante 10 min, y se registraron nuevamente los espectros.

#### Análisis de péptidos de las Fe-SODs expuestas a peroxinitrito

Las Fe-SOD (8 µM) fueron tratadas con peroxinitrito (0-300 µM) en buffer fosfato de sodio (200 mM, pH 7,4) a 25°C en presencia o ausencia de DMPO (100 mM). Las muestras se separaron mediante electroforesis en gel de una o dos dimensiones. Para la separación en la primera dimensión, se utilizaron tiras IPG disponibles comercialmente (7 cm, lineales 3-10, GE Healthcare). Las enzimas se purificaron y se concentraron utilizando el kit 2-D Cleanup de GE Healthcare y se disolvieron en 125 µL de solución de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% m/v, buffer IPG 3-10 (GE Healthcare) 0.5 % v/v, azul de bromofenol 0.002% m/v y DTT 17 mM). Las muestras en solución de rehidratación se cargaron en las tiras IPG por rehidratación pasiva durante 12 h a temperatura ambiente. El enfoque isoeléctrico se realizó en una unidad IPGphor (GE Healthcare) que emplea el siguiente perfil de voltajes: una fase constante de 300 V durante 30 min, un aumento lineal a 1000 V en 30 min, un aumento lineal a 5000 V en 80 min, y una fase final constante de 5000 V para alcanzar un total de 2.0 kVh. Antes de correr la segunda dimensión, las tiras IPG se redujeron durante 15 min en buffer de equilibrado (urea 6 M, Tris-HCl 75 mM, pH 8.8, glicerol 29.3 % v/v, SDS 2 % m/v, azul de bromofenol 0.002 % m/v y DTT 10 mg/mL) y posteriormente se alquilaron con iodoacetamida (25 mg/mL). La segunda dimension se realizó en gel con SDS de 15 % utilizando una unidad de electroforesis en gel vertical SE 260 (GE Healthcare). Los geles se tiñeron con Coomasie Blue G-250 coloidal. Las imágenes fueron digitalizadas usando un escáner UMAX Power-Look 1120 y Software LabScan versión 5.0 (GE Healthcare). Algunos puntos (del inglés: spots) fueron seleccionados de los geles bidimensionales o bandas de geles unidimensionales y fueron extraídos manualmente y digeridos in situ dentro del gel con tripsina (grado secuenciación, Promega) como se describió previamente<sup>(261)</sup>. Los péptidos se extrajeron de los geles utilizando una mezcla de acetonitrilo y agua (60 % v/v) que contenía ácido trifluoroacético (TFA, 0.1 % v/v) y se concentraron en un concentrador de vacío. Las mezclas de péptidos se analizaron usando un espectrómetro de masas con trampa de iones lineal (LTQ Velos, Thermo) acoplado en línea a un sistema de cromatografía líquida (Easy-nLC, Proxeon-Thermo) o, alternativamente, usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (4800 MALDI TOF/TOF, ABi Sciex). En el método n-LC/MS, los péptidos fueron separados en una columna de fase reversa (Aquasil C18 100 mm, diámetro interno de 75  $\mu$ m, PicoFRIT de New Objective) y eluyeron en un gradiente lineal de acetonitrilo (0.1 % ácido fórmico, 0-40 % acetonitrilo en 55 min) a un flujo de 0.3 μL/min. El voltaje del ionizador de tipo *electrospray* fue de 1.4 kV y la temperatura del capilar de 200°C. Los péptidos se detectaron en modo positivo utilizando un rango de masas de 300 a 2000, y se realizó MS/MS a los cinco picos más abundantes de cada segmento, adquiriéndose los datos de forma datos-dependiente. Los péptidos fueron identificados utilizando bases de datos públicas (NCBInr, Noviembre 2012) y usando los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia, 1.2 Da; tolerancia MS/MS, 0.8 Da; y, oxidación de metioninas y nitración de tirosinas como modificaciones variables. El límite de significancia para la identificación del péptido se fijó en p < 0.05. En los experimentos de MALDI TOF/TOF se utilizó el modo positivo y los espectros de masa se calibraron externamente utilizando una mezcla de estándares de péptidos (Applied Biosystems). La secuencia de los péptidos se confirmó por análisis MS/MS de los iones seleccionados.

# Cuantificación de nitro-tirosina

Para la cuantificación total de 3-NT, se agregó peroxinitrito (0.05-3000  $\mu$ M) a las Fe-SODs (8-16  $\mu$ M) en buffer fosfato de sodio (200 mM, pH 5.8-8). Se removió el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> residual mediante dos precipitaciones consecutivas con acetonitrilo (un volúmen) por 40 min a 4°C seguido de una centrifugación a 14000 g por 40 min a 4°C. Las proteínas se resuspendieron en agua nanopura (500  $\mu$ L) conteniendo los estándares internos [U-<sup>13</sup>C<sub>9</sub><sup>15</sup>N<sub>1</sub>]Tyr (tirosina marcada universalmente) 20 nmol; [NO<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Tyr 500 pmol y [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Tyr<sup>(262)</sup>. Los precursores estables marcados isotópicamente se utilizaron como estándares internos para la cuantificación de la tirosina y la 3-NT total presente en la proteína ([U-<sup>13</sup>C<sub>9</sub><sup>15</sup>N<sub>1</sub>]Tyr y [NO<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Tyr respectivamente). La [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Tyr se utilizó para monitorear la generación artefactual de 3-NT durante el procesamiento de la muestra. Las proteínas se hidrolizaron durante toda la noche a 116°C en HCl (6 N) utilizando tubos de hidrólisis especiales (Pierce). Luego de la hidrólisis, las muestras se evaporaron y el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de ácido fórmico (0.1 % v/v) y se analizaron por LC-MS/MS (Qtrap Applied Biosystems) como se describió previamente<sup>(263)</sup>.

## Cristalización de la Fe-SODA

La estructura de la Fe-SODA se dilucidó con una resolución de 2.23 Å en colaboración con el Dr. Alejandro Buschiazzo en la plataforma de cristalografía de proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo (código 4DVH). Los cristales de la Fe-SODA se obtuvieron a partir de 2.33 mg/mL de proteína recombinante pura. Por más detalles del método de cristalización ir a la referencia (98).

# Simulaciones de dinámica molecular (MD) y transferencia de electrones intramolecular (IET)

Las simulaciones de MD y los análisis de las posibles vías de IET se realizaron en colaboración con el Dr. Ariel Petruk, el Dr. Marcelo Martí y el Dr. Diego Moreno, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de Buenos Aires los dos primeros y de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de Rosario el último. La estructura de la Fe-SODB WT que se utilizó para la MD se descargó del banco de datos de proteínas (2GPC). Por más detalles del método de MD e IET ir a la referencia<sup>(98)</sup>.

### Parásitos

Epimastigotas WT de la cepa CL-Brener se cultivaron a 28°C en medio "brain heart infusión" (BHI) como se describió previamente<sup>(60)</sup>. Los parásitos que sobrexpresan de forma inducible la enzima Fe-SODA (pTcINDEX-9E10) se mantuvieron en BHI en presencia de G418 (100  $\mu$ g/mL). Esta cepa sobrexpresante contiene el epítope 9E10 en su porción C-terminal la cual deriva de la proteína c-Myc<sup>(60, 264)</sup>. La inducción de la expresión de la Fe-SODA se realiza en presencia de 2  $\mu$ g/mL de tetraciclina en el medio de cultivo durante 3 días como se describió previamente<sup>(60)</sup>.

#### Tratamiento nitroxidativo de los epimastigotas

Epimastigotas (5 x 10<sup>8</sup> parásitos/mL, en PBS a pH 7.4) se trataron con el inhibidor del complejo III mitocondrial antimicina A (AA, 5  $\mu$ M) en presencia de NOC-12 (5 mM, t<sub>1/2</sub> = 100 min a pH 7.4) o, alternativamente, se trataron con 3-morfolinosidnonimina (SIN-1, 5 mM) o peroxinitrito (tres dosis sucesivas de 100 μM) durante 3 horas a 28°C bajo agitación<sup>(163)</sup>. Luego del tratamiento los parásitos se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en Tris-HCl (40 mM, pH 7.4) conteniendo urea (7 M), tiourea (2 M), CHAPS (4 % m/v), PMSF (1 mM) y DTT (1 % m/v). Posteriormente se realizó una separación por electroforesis en dos dimensiones utilizando tiras IPG comerciales (7 cm, 3-10 no lineal, GE Healthcare). Las muestras (390 µg) se disolvieron en solución de rehidratación (urea 7M, tiourea 2 M, CHAPS 2 % m/v, IPG buffer 3-10 (GE Healthcare) 0.5 %, azul de bromofenol 0.002 % m/v y DTT 17 mM) y se cargaron pasivamente en las tiras IPG durante 12 h a temperatura ambiente. El enfoque isoeléctrico se realizó en una unidad IPGphor de GE Healthcare utilizando el siguiente perfil de voltajes: aumento lineal hasta 150 V en 30 min, una fase constante a 300 V durante 2 h, una fase constante de 500 V durante 1 h, una fase constante de 1000 V durante 1 h, un aumento lineal a 5000 V en 30 min y una fase final constante de 5000 V por 6 h para lograr un total de 33.6 kVh. Antes de la segunda dimensión, las tiras se incubaron durante 15 min en buffer de equilibrado (urea 6 M, Tris-HCl 75 mM, pH 8.8, glicerol 29.3 % v/v, SDS 2 % m/v, azul de bromofenol 0.002 % m/v) suplementado con DTT (10 mg/mL) para reducir las proteínas y finalmente en buffer de equilibrado suplementado con iodoacetamida (25 mg/mL) para alquilar los tioles. La segunda dimensión se realizó en un gel de poliacrilamida con SDS al 15 % utilizando una unidad SE 260 de GE Healthcare. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (40 mA, o/n) y se bloquearon con 5 % m/v de leche descremada en PBS durante 1 h. Las membranas se revelaron utilizando los anticuerpos policionales de ratón anti-T. cruzi Fe-SODA o Fe-SODB (1/2000) como se describió en el apartado anterior.

### Inmunoprecipitación de la Fe-SODA

Epimastigotas sobrexpresantes de la Fe-SODA se expusieron a diferentes condiciones de estrés nitroxidativo como se describió en el apartado anterior. Luego del tratamiento, los parásitos (1 x 10<sup>9</sup>) se lavaron tres veces en PBS y se lisaron con 250 μL de Tris-HCl (20 mM, pH 7.5) conteniendo NaCl (150 mM), EGTA (1 mM), Nonidet P-40 (1 %), deoxicolato de sodio (1 %) e inhibidores de proteasas comerciales de Sigma. Luego de 15 min en hielo las muestras se centrifugaron a 4°C y 13000 g y los sobrenadantes se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-cMyc (30 µg, Santa Cruz Biotechnology) y esferas de agarosa ligadas a proteína A/G (20  $\mu$ L, Santa Cruz Biotechnology) a 4°C en agitación. Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 800 g y las esferas de agarosa se lavaron 4 veces en buffer de lisis. Las proteínas unidas a la agarosa se liberaron incubando las esferas con 50 μL de buffer de la muestra Laemmli conteniendo β-mercaptoetanol (5 % v/v) durante 5 min a 100°C. Las proteínas se separaron posteriormente en un gel de poliacrilamida al 15 % con SDS, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron utilizando los anticuerpos anti-cMyc (9E10) y anti-3-NT. Las proteínas inmunoprecipitadas se visualizaron como se mencionó anteriormente utilizando los anticuerpos anti-ratón IR Dye-680 (para el epítope 9E10 en la Fe-SODA) y anti-conejo IR Dye-800 (para las proteínas que contienen 3-NT).

# Análisis de datos

Los datos presentados en este capítulo, a no ser que se especifique lo contrario, corresponden a las medias de replicados independientes  $\pm$  SEM. Las medias se compararon utilizando el test *t* de Student en donde un *p* < 0.05 se consideró significativo.

## Resultados

#### Purificación y caracterización de la Fe-SODA y Fe-SODB

Se optimizó un método de expresión y purificación a partir de cultivos de *E. coli* de las proteínas de *T. cruzi* Fe-SODA y Fe-SODB recombinantes. Las enzimas se lograron obtener puras (99 %), activas y en su estructura cuaternaria nativa (homodímeros). Utilizando un método colorimétrico se determinó que las enzimas contenían un átomo de hierro por monómero. La masa molecular aparente de cada monómero fue de 23 y 22.6 kDa para la Fe-SODA y Fe-SODB respectivamente (Figura 24, A y B), lo cual es consistente con los valores obtenidos *in silico* a partir de las secuencias de las proteínas. Todas las preparaciones utilizadas en este capítulo fueron de alta pureza (99 %) con actividades específicas de 2647 y 3551 U/mg para la Fe-SODA y Fe-SODB respectivamente, siendo estos valores similares a los previamente reportados para las Fe-SODS de *T. brucei*<sup>(211)</sup>.





Figura 24. Purificación de las Fe-SODs recombinantes y constantes de reacción con O2". A. Electroforesis y tinción de Coomasie blue en gel al 15 % con SDS de muestras tomadas durante la purificación de la Fe-SODA (con la Fe-SODB se obtuvieron resultados similares). 1: extracto total luego de la inducción con IPTG (0.8 mM, o/n, 22°C). 2-9: Fracciones de elución de la columna de afinidad utilizando un gradiente lineal de imidazol (10-500 mM). B. Análisis mediante gel filtración de las fracciones puras utilizando una columna Superdex 200. En el inset se muestra la curva de calibración (estándares, STD, 13000-75000 Da). C. La reducción del cyt c (20 µM) se monitoreó a 550 nm y 37°C en presencia (V<sub>SOD</sub>) o ausencia (V<sub>0</sub>) de Fe-SODs. Se graficó la FI ((V<sub>0</sub>-V<sub>SOD</sub>)/V<sub>0</sub>) en función de la concentración de Fe-SOD y se ajustó la curva a una hipérbola rectangular para obtener el valor de [Fe-SOD]50. Este dato se utilizó para calcular las constantes de reacción con el O2 ·· como se describe en "Materiales y métodos".

# Determinación de las constantes de reacción con O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y peroxinitrito

Mediante un ensayo de competencia con la proteína citocromo c se determinaron las constantes de reacción de las Fe-SODs con el  $O_2^{\bullet-}$  a pH 7.8, siendo de 4.5 ± 1.8 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y 7.6 ± 1.5 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para la Fe-SODA y Fe-SODB respectivamente **(figura 24, C y tabla 5)**. Estos valores son similares a los ya reportados para otras Fe-SODs, las cuales suelen poseer constantes de reacción menores que las Cu/Zn-SODs<sup>(265)</sup>.

Enzima	k O₂•- (M⁻¹s⁻¹)	<i>k</i> ONOO <sup>-</sup> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Tabla 5. Constantes de reacción de las Fe-SODs con O <sub>2</sub> • y peroxinitrito. Las constantes de reacción con el
Fe-SODA	$4.5 \pm 1.8 \times 10^8$	$4.6 \pm 0.2 \times 10^4$	O <sub>2</sub> •• se determinaron mediante un metodo de competencia como se describió en la leyenda de la figura 24 a pH 7.8 x 37°C. Las constantes de reacción
Fe-SODB	7.6 ± 1.5 x 10 <sup>8</sup>	$4.3 \pm 0.4 \times 10^4$	con el ONOO <sup>-</sup> se determinaron mediante el método de velocidades iniciales a pH 7.4 v 37°C como se
Fe-SODB + NEM	ND	$4.3 \pm 0.2 \times 10^4$	describe en la leyenda de la figura 25. ND: no determinado.

Las constantes de reacción del peroxinitrito con las Fe-SODs se determinaron a pH 7.4 y 37°C siguiendo el decaimiento de este compuesto en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de Fe-SOD (0-15 µM) como se describió previamente<sup>(175)</sup>. Al graficar la velocidad inicial de descomposición del peroxinitrito (V<sub>0</sub>) (figura 25, inset) en función de la concentración de Fe-SOD se obtuvo una correlación lineal (figura 25) cuya intersección en el eje y (x = 0) se corresponde con la descomposición espontánea del peroxinitrito a pH 7.4 y 37°C. Dividiendo la pendiente de la curva obtenida con la concentración de peroxinitrito, se obtuvieron las constantes de reacción de segundo orden, siendo de 4.6  $\pm$  0.2 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y 4.3  $\pm$  0.4 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> por monómero para la Fe-SODA y Fe-SODB respectivamente. Nuevamente estos valores resultaron similares a los previamente resportados para otras SODs (tabla 5)<sup>(175, 266, 267)</sup>. Para poder dilucidar si el valor obtenido se debía a la reacción entre el peroxinitrito con los residuos aminoacídicos de las Fe-SODs (principalmente residuos de cisteína)<sup>(256)</sup> o a la reacción con el metal en el sitio activo, se determinó la constante de reacción en presencia de Fe-SOD cuyos tioles habían sido previamente bloqueados con NEM. Al utilizar la Fe-SOD bloqueada con NEM, el valor obtenido resultó ser muy similar al de la enzima sin tratar (tabla 5), por lo tanto este resultado indica que el peroxinitrito reacciona con un elemento de la proteína diferente a



los residuos de cisteína, siendo el candidato más probable el átomo de Fe presente en el sitio activo.

**Figura 25. Constantes de reacción con peroxinitrito.** La cinética de descomposición del peroxinitrito en ausencia o presencia de Fe-SODs se monitoreó a 302 nm, pH 7.4 y 37°C en un espectrofotómetro de flujo detenido. Los primeros 0-0.15 s se utilizaron para calcular las V<sub>0</sub> como se describió en "Materiales y métodos". Se muestra la media  $\pm$  SEM de n = 7. *Inset*: Registros primarios de descomposición del peroxinitrito a diferentes concentraciones de Fe-SODB medidas a pH 7.4 y 37°C. *AU:* unidades de absorbancia.

# Inactivación y nitración de las Fe-SODs expuestas a peroxinitrito

Luego de determinar las constantes de reacción, se plantearon experimentos para determinar la inactivación y/o nitración de las enzimas expuestas a peroxinitrito. La adición de este compuesto (0-1200  $\mu$ M, pH 7.4) a las Fe-SODs (8  $\mu$ M) condujo a la inhibición de la actividad enzimática en forma dosis-dependiente, aunque sorpresivamente, con susceptibilidades muy diferentes **(figura 26 A).** La isoforma citosólica, Fe-SODB, resultó ser mucho más resistente a la inactivación por peroxinitrito que la isoforma mitocondrial, Fe-SODA. Este resultado nos resultó intrigante, dado que *a priori* las estructuras de ambas enzimas son similares y por tanto esperábamos una suseptibilidad comparable entre ambas isoformas<sup>(209, 210)</sup>. Por otra parte, la inactivación enzimática se acompañó de nitración, la cual nuevamente resultó ser mayor en la isoforma más sensible, Fe-SODA **(Figura 26 B).** 



Figura 26. Inactivación y nitración peroxinitrito-dependiente de las Fe-SODs. A. Las enzimas (8 µM) se expusieron a un bolo de peroxinitrito (0-1200 µM) en buffer fosfato (200 mM, pH 7.4) y la actividad residual se midió como se describe en "Materiales y métodos". La actividad se expresa como porcentaje relativo al control en ausencia de peroxinitrito (100 % de actividad). Se muestra la media ± SEM de n = 3. B. Detección por Western blot de 3-NT en las Fe-SODs. Las enzimas (8 µM) se expusieron a un bolo de peroxinitrito (0-1200 µM) en buffer fosfato (200 mM, pH 7.4) y se analizaron utilizando el anticuerpo policional de conejo anti-3-NT y el kit de quimioluminiscencia Immun-Star. El control de carga se realizó mediante tinción de la membrana con Ponceau-S (rosado).

Posteriormente se procedió a dilucidar el mecanismo de inactivación por peroxinitrito de las enzimas. La Fe-SODA y la Fe-SODB poseen siete y nueve residuos de tirosina respectivamente, los cuales, dependiendo del caso, se encuentran expuestos al solvente o dentro de la estructura proteica. Ambas enzimas contienen una tirosina cercana al sitio activo (Tyr35), la cual ya se ha visto implicada en la inactivación por peroxinitrito de la Mn-SOD humana. Por lo tanto, la nitración observada podría deberse a la nitración de la Tyr35 (y conducir a la inactivación) o a la nitración de tirosinas no críticas expuestas al solvente. Para que ocurra nitración peroxinitrito-dependiente, primero debe formarse el radical tirosilo y luego éste debe reaccionar con una molécula de  ${}^{\circ}NO_{2}$ . En las condiciones utilizadas en nuestro experimento, existen dos vías posibles donde se podrían generar especies reactivas capaces de producir nitración ${}^{(148, 268)}$ : 1) la homólisis del ONOOH, lo cual genera  ${}^{\circ}NO_{2}$  y  ${}^{\circ}OH$  y 2) la reacción del ONOO con el centro metálico de la enzima, lo cual produce un complejo oxo-metálico y  ${}^{\circ}NO_{2}$ . Para poder dilucidar cuál de las dos vías era la responsable de la inactivación se aprovechó el hecho de que ambas vías parten de una



forma de peroxinitrito diferente (protonado o desprotonado), por lo tanto repetimos el mismo ensayo de inactivación enzimática pero esta vez a diferentes pHs y en presencia o

ausencia de CO2 (que compite en la reacción con el ONOO<sup>-</sup>)<sup>(269)</sup>. El tratamiento de la Fe-SODA con peroxinitrito (150 µM) a pH ácidos (donde la mayoría del peroxinitrito decae por homólisis) derivó en una pequeña inactivación y altos niveles de nitración (figura 27). Al contrario, a pH básicos, la inactivación fue pronunciada y los niveles de nitración fueron pequeños (figura 27, A y B). Estos resultados indican que la especie responsable de la inactivación es el ONOO<sup>-</sup> vía reacción directa con el centro metálico de la enzima y nitración específica en el sitio activo. En concordancia con lo anterior, la presencia de bicarbonato (25 mM, 1.2 mM CO<sub>2</sub>) protegió a la Fe-SODA de la inactivación dependiente de peroxinitrito (figura 27 C), como se observó previamente con la Mn-SOD de *E. coli*<sup>(175)</sup>. La reacción del ONOO<sup>-</sup> con el CO<sub>2</sub> ( $k = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH 7.4 y 37°C) genera  $^{\circ}NO_2$  y  $CO_3^{\circ-(156)}$ . Por lo tanto, es de esperar que el CO<sub>2</sub> compita con el Fe de la enzima por el ONOO<sup>-</sup>, generando radicales secundarios capaces de oxidar y nitrar tirosinas críticas no sin causar inactivación<sup>(270-272)</sup>.

Figura 27. Efectos del pH y el CO<sub>2</sub> en la inactivación por peroxinitrito de las Fe-SODs. A. Las enzimas (8  $\mu$ M) se expusieron a un bolo de peroxinitrito (150  $\mu$ M) en buffer fosfato (100 mM) a diferentes pHs (5.5-8.0). La actividad residual se midió como se describe en "Materiales y

métodos" y se expresa como porcentaje relativo al control en ausencia de peroxinitrito y al pH correspondiente (100 % de actividad). Se muestra la media  $\pm$  SEM de n = 3. **B.** Detección por Western blot de 3-NT en las Fe-SODs. Las enzimas (8  $\mu$ M) se expusieron a un bolo de peroxinitrito (150  $\mu$ M) en buffer fosfato (100 mM) a diferentes pHs (5.5-8.0) y se analizaron utilizando el anticuerpo anti-3-NT (verde) y los anticuerpos anti-Fe-SODA y anti-Fe-SODB (rojo), los cuales se utilizaron como control de carga. **C.** Las enzimas (8  $\mu$ M) se expusieron a un bolo de peroxinitrito (0-100  $\mu$ M) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) en ausencia o presencia de bicarbonato (24 mM, CO<sub>2</sub> = 1.3 mM). La actividad residual se midió como se describe en "Materiales y métodos" y se expresa como porcentaje relativo al control en ausencia de peroxinitrito (100 % de actividad). Se muestra la media  $\pm$  SEM de n = 3.

# La inactivación de las Fe-SODs se debe a la nitración selectiva de la Tyr35

Para confirmar que la inactivación se debía a la nitración preferencial de la Tyr35 cercana al sitio activo, se expusieron las enzimas (8  $\mu$ M) a peroxinitrito (0-300  $\mu$ M) y se separaron las especies resultantes mediante electroforesis en dos dimensiones. Diferentes *spots* se seleccionaron y se analizaron mediante nano-LC/MS. En el caso de las enzimas sin tratar, se observó la presencia de un *spot* mayoritario y otros minoritarios, indicando que las enzimas presentan modificaciones post-traduccionales que afectan su punto isoeléctrico. En el caso de las enzimas tratadas, la separación reveló en ambos casos un mayor número de *spots* con puntos isoeléctricos más ácidos. Este cambio resultó ser más drástico para la Fe-SODA, en concordancia con su mayor susceptibilidad al oxidante **(figura 28 A)**. Cabe mencionar que en las proteínas tratadas con peroxinitrito se espera la aparición de *spots* con pl más ácidos debido al cambio en el pKa de la 3-NT (7.3) con respecto al de la tirosina (10.3), lo cual implica una ganancia de carga negativa<sup>(170)</sup>. El análisis por espectrometría de



masa del *spot* mayoritario (pl = 7.5) de la Fe-SODB expuesta a peroxinitrito (150  $\mu$ M) reveló la presencia de un solo péptido nitrado (m/z = 790) que se corresponde al ion molecular triplemente cargado cuya secuencia es

<sup>31</sup>HHQG<sup>35</sup>**Y**VTKLNAAAQTNSALATK<sup>52</sup> (figura 28 B). Este resultado confirma la nitración selectiva de la Tyr35 en estas condiciones experimentales. А concentraciones más altas de peroxinitrito (600-1000 μM), otros péptidos conteniendo tirosinas expuestas al solvente se encontraron nitrados (Tyr177) (tabla 6). En el caso de la Fe-SODA, la misma tirosina crítica (en este caso Tyr36) se encontró preferencialmente nitrada luego de la adición de 100 µM de peroxinitrito, aunque esta vez en un péptido dinitrado el cual contenía a la Tyr36 y la Tyr 29 **(tabla 6)**.

**Figura 28. Mapeo peptídico de las Fe-SODs luego del tratamiento con peroxinitrito. A.** Las enzimas (8  $\mu$ M) se expusieron a un bolo de peroxinitrito (150  $\mu$ M) en buffer fosfato (200 mM, pH 7.4) y se analizaron mediante electroforesis en dos dimensiones como se describe en "Materiales y métodos". La punta de flecha muestra el *spot* de la Fe-SODB seleccionado para analizar por MS. **B.** Espectro de MS/MS del ion triple cargado de m/z 790.6 (MH<sup>+</sup> 2369.7, tiempo de retención 30.3 min). La muestra se obtuvo a partir de la digestión tríptica del *spot* marcado con la punta de flecha en el panel A. El espectro corresponde a la secuencia señalada en el *inset* que contiene la Tyr35 nitrada (mascot ion score = 61; p < 0.05)

Por otro lado se cuantificó la cantidad de 3-NT total en ambas enzimas expuestas a peroxinitrito (0-3000 y 0-100 µM para la Fe-SODB y Fe-SODA respectivamente) para lograr correlacionar la inactivación enzimática con la nitración. Los resultados se muestran en la **tabla 7**, expresados como la cantidad de 3-NT por monómero de Fe-SOD. Asimismo, se calcularon valores teóricos de 3-NT asumiendo que la inactivación se debe solamente a la nitración de una tirosina por monómero. En dicho caso una inactivación de 100 % se correspondería con una cantidad de 3-NT/monómero de uno. En el caso de la Fe-SODB a pH 8, se observó una correlación lineal entre el porcentaje de inactivación y el total de 3-NT cuantificado, indicando claramente que la inactivación se debe a la nitración selectiva de la Tyr35. En el caso de la Fe-SODA a pH 8, en concordancia con los resultados anteriores, se obtuvieron valores mayores de 3-NT en comparación a la Fe-SODB **(tabla 7)**. Sin embargo, los valores de 3-NT cuantificados por LC-MS/MS fueron menores que los teóricos según el grado de inactivación medido, lo cual podría deberse a la presencia adicional de

otras modificaciones oxidativas que pudiesen conducir a la inactivación enzimática, algunas de las cuales pudimos observar por MALDI-TOF/MS **(tabla 6)**. Por tanto, en el caso de la isoforma más susceptible, Fe-SODA, otras modificaciones podrían también contribuir a la inactivación. Es importante notar que el tratamiento de la Fe-SODA con peroxinitrito a pH 5.8 resultó en valores de 3-NT mayores que los calculados a partir del 16 % de inactivación medido **(tabla 7)**. Esto concuerda con el hecho de que a pH ácidos se favorece la homólisis del peroxinitrito lo cual afectará en mayor grado y de forma no selectiva a tirosinas de la proteína expuestas al solvente.

Peroxinitrito	Masa observada ((M+H) <sup>+</sup> )	Masa teórica ((M+H) <sup>+</sup> )	Secuencia asignada
μм	Da	Da	
Fe-SODB			
150	2127.09	2127.04	<sup>21</sup> K.QQVTLH <sup>28</sup> YDKHHQG <sup>35</sup> YVTK <sup>38</sup> + Nitro(Y)
600	2127.00	2127.04	<sup>21</sup> K.OOVTLH <sup>28</sup> YDKHHOG <sup>35</sup> YVTK <sup>38</sup> + Nitro(Y)
	1014.46	1014.47	<sup>30</sup> K.HHQG <sup>35</sup> YVTK <sup>38</sup> + Nitro(Y)
	2156.00	2156.03	<sup>172</sup> K.NDRAA <sup>177</sup> YVOTFWNVVNWK <sup>188</sup> + Nitro(Y)
	1770.82	1770.86	<sup>175</sup> R.AA <sup>177</sup> YVOTFWNVVNWK <sup>188</sup> + Nitro(Y)
	2269.10	2269.11	<sup>175</sup> R.AA <sup>177</sup> YVOTEWNVVNWKNVER <sup>192</sup> + Nitro(Y)
1000	2127.08	2127.04	<sup>21</sup> K.OOVTLH <sup>28</sup> YDKHHOG <sup>35</sup> YVTK <sup>38</sup> + Nitro(Y)
	1770.88	1770.86	<sup>175</sup> R.AA <sup>177</sup> YVOTEWNVVNWK <sup>188</sup> + Nitro(Y)
	2269.17	2269.11	<sup>175</sup> R.AA <sup>177</sup> YVQTFWNVVNWKNVER <sup>192</sup> + Nitro(Y)
Fe-SODA			
100	3095.54	3095.50	<sup>14</sup> DGCAPVLSPROLELH <sup>29</sup> YTKHHKA <sup>36</sup> YVDK <sup>40</sup> + 2Nitro(Y)
	2096.02	2096.06	$^{155}$ GLRPVFTVDVWEHA $^{169}$ Y $^{170}$ YK $^{171}$ + Ox(Y)
	3337.64	3337.66	$^{177}$ RVD $^{180}$ YLKEIWTIVDWEFVSRT $^{127}$ YEOAMK $^{132}$ + Ox(Y) + Ox(M)
150	2868.39	2868.39	<sup>40</sup> LNALAGAT <sup>48</sup> YDGKT <sup>53</sup> MEDIIVALANDSEK <sup>66</sup> + Nitro(Y)
	2884.37	2884.39	<sup>40</sup> LNALAGAT <sup>48</sup> YDGKT <sup>53</sup> MEDIIVALANDSEK <sup>66</sup> + Nitro(Y); Ox(M)
	2096.03	2096.06	$^{155}$ GLRPVFTVDVWEHA $^{169}$ Y $^{170}$ YK $^{171}$ + Ox(Y)
	2125.03	2125.04	$^{155}$ GLRPVFTVDVWEHA $^{169}$ Y $^{170}$ YK $^{171}$ + Nitro(Y)
	2112.03	2112.06	$^{155}$ GLRPVFTVDVWEHA $^{169}$ Y $^{170}$ YK $^{171}$ + 2Ox(Y)
	2314.16	2314.17	$^{178}$ VD $^{180}$ YLKEIWTIVDWEEVSR $^{195}$ + Ox(Y)

Tabla 6. Péptidos modificados por peroxinitrito detectados en las Fe-SODs mediante MALDI-TOF MS. Las enzimas (8  $\mu$ M) se expusieron a un bolo de peroxinitrito (0-1000  $\mu$ M), se sometieron a una electroforesis con SDS y las bandas se hidrolizaron *in gel* con tripsina. Los péptidos resultantes se analizaron mediante MADLI-TOF MS y los datos se compararon con la base de datos MASCOT. Ox: oxidación.

Enzima	ОNООН (µM)	Actividad (%)	3-NT/monómero Experimental	3-NT/monómero Teórico	Tabla 7. Luego del
Fe-SODB	0 500	100 82.8	0 0.18	0 0.17	tratamiento con peroxinitrito (0-3000 μM) las Fe-SODs se
(pH = 8)	1500 3000	74.5 35	0.29 0.66	0.26 0.65	hidrolizaron durante toda la noche a 116°C en HCl (6 N), el pellet
Fe-SODA (pH = 8)	0 100	100 56	0.03 0.26	0 0.43	se resuspendió en ácido fórmico (0.1 % v/v) y las muestras se
Fe-SODA (pH = 5.8)	100	84	0.33	0.16	analizaron mediante LC-MS/MS como se describe en

métodos". Los valores de 3-NT/monómero teóricos se calcularon asumiendo que la inactivación enzimática se debe únicamente a la nitración de la Tyr35.

# Cristalización de la Fe-SODA y diferencias estructurales con la Fe-SODB

De forma de poder encontrar una explicación a las diferencias observadas en la susceptibilidad de las enzimas hacia el peroxinitrito, obtuvimos la estructura a partir del cristal de la Fe-SODA (código asignado 4DVH) y la comparamos con la estructura previamente reportada de la Fe-SODB (2GPC)<sup>(273)</sup>. La Fe-SODA resultó ser un dímero **(figura 29 A)** cuya estructura global se asemeja a la de otras Fe-SODs previamente resueltas<sup>(273, 274)</sup>. La estructura secundaria de uno de los monómeros, junto a la nomenclatura utilizada,

#### Capítulo 1 Resultados

se muestra en la **figura 29 B**. Cada monómero contiene un átomo de Fe en un bolsillo que se encuentra entre los dos dominios. El metal se encuentra penta-coordinado a la His28 (hélice  $\alpha$ 1), His79 ( $\alpha$ 3), Asp163 ( $\beta$ 3), His167 (en el loop entre hélice  $\beta$ 3 y  $\alpha$ 6) y una molécula de agua. Al igual que en otras Fe-SODs, la geometría de la coordinación del metal es trigonal bi-piramidal. La Fe-SODA es estructuralmente muy similar a la Fe-SODB presentando una desviación cuadrática media de 1.14 Å al superponer todo el dímero (1843 átomos). La identidad y posición de los residuos que coordinan al Fe se encuentran totalmente conservados, incluyendo las moléculas de agua. La segunda esfera de coordinación (residuos que se encuentran interaccionando con la primera esfera de coordinación o que delimitan el canal hacia el sitio activo) también se encuentra conservada en ambas isoformas **(figura 29 C)** e incluye a la Tyr35<sup>(275)</sup> a 5.6 Å del centro metálico.



Sin embargo, pese a que la estructura global es casi idéntica entre ambas isoformas, se encontraron diferencias importantes entre la Fe-SODA y Fe-SODB en la posición y número de cisteínas y triptofanos. De las cuatro cisteínas presentes en la Fe-SODA y las tres presentes en la Fe-SODB, sólo una de ellas se encuentra estructuralmente conservada (Cys150 y Cys146 respectivamente, **figura 30**). Asimismo, el análisis de triptofanos reveló que existían diferencias substanciales en la región de la interfase entre las hélices  $\alpha 1 y \alpha 3$ . En la Fe-SODB se encuentran dos triptofanos (Trp9 y Trp79) que están ausentes en la Fe-

SODA, a 11.6 Å y 6.6 Å del centro metálico respectivamente. Vistas estas diferencias, se planteó la hipótesis de que las mismas podrían explicar las diferentes susceptibilidades a la inactivación y nitración por peroxinitrito.



**Figura 30. Estudio comparativo de las cisteínas y triptofanos en las Fe-SODs. A.** Estructura de la Fe-SODA. Todas las Cys y Trp se resaltan coloreados por átomo. Se muestra el sitio activo como referencia, con la primera esfera de coordinación resaltada y el átomo de Fe representado como una esfera negra. El agua no se muestra. Se puede observar de forma semi-transparente los elementos de estructura secuendaria presentes en la región. B. Estructura de la Fe-SODB (código 2GPC). Se muestra al igual que en A las Cys y Trp, el átomo de hierro y los elementos de estructura secundaria semi-transparentes.

### Mecanismo de resistencia a la inactivación por peroxinitrito en la Fe-SODB

Dadas las diferencias estructurales encontradas en los residuos de cisteínas y triptófanos de la Fe-SODA y la Fe-SODB se planteó la hipótesis de si podría existir un mecanismo de transferencia electrónica intramolecular (IET) en la Fe-SODB que involucrase a estos aminoácidos y a la Tyr35. Existen numerosas evidencias de IET en proteínas<sup>(260, 276, 277)</sup> las cuales suelen involucrar a cisteínas, triptofanos y tirosinas (E<sup>o</sup>' Trp<sup>•</sup>,H<sup>+</sup>/TrpH = 1.025 V, E<sup>o</sup>' Tyr<sup>•</sup>,H<sup>+</sup>/TyrH = 0.97 V y E<sup>o</sup>' RS<sup>•</sup>,H<sup>+</sup>/RSH = 0.96 V)<sup>(150, 278)</sup>. Debido a esto, nos planteamos que



el mecanismo de IET en la Fe-SODB podría ocurrir de forma similar a lo que ocurre en la enzima ribonucleótido reductasa (figura **31**), pero en este caso desde un residuo de cisteína hasta el radical tirosilo de la Tyr35, previniéndose de esta manera la nitración e inactivación<sup>(279, 280)</sup>.

**Figura 31.** Residuos implicados en el IET que ocurre durante el mecanismo catalítico de la enzima ribonucleótido reductasa de clase I. El IET comienza con la formación de un radical tirosilo en la tirosina 122 (Y122) en la subunidad R2 y termina con la formación de un radical tiílo (Cys-S<sup>•</sup>) en la cisteína 439 (C439) en la subunidad R1. La distancia total del IET es de aproximadamente 35 Å. *Tomado de Reece y col. 2006*<sup>(276)</sup>.

La Fe-SODB posee dos cisteínas expuestas al solvente (medido mediante titulación con DTNB y análisis de la estructura tridimensional, **figura 30**). Al bloquear dichas cisteínas con el agente alquilante NEM, la susceptibilidad de la enzima hacia el peroxinitrito aumentó significativamente (figura 32 A). Esto sugiere que las cisteínas expuestas (Cys83 y/o Cys146) participan en el mecanismo de resistencia de la Fe-SODB hacia el peroxinitrito. Estudios mecanísticos previos utilizando péptidos cuya secuencia contiene tirosina y cisteína mostraron que el mecanismo de IET requiere como primer paso la desprotonación del residuo de cisteína para formar el correspondiente tiolato<sup>(277, 280, 281)</sup>. Debido a esto, estimamos el pKa de cada cisteína de ambas Fe-SODs utilizando el software propKa<sup>(282-285)</sup>. Los resultados obtenidos con dicho programa predijeron que todos los pKa de las cisteínas presentes en la Fe-SODA y los pKa de dos de las tres cisteínas de la Fe-SODB (Cys146 y Cys159) son similares a los observados para la cisteína libre (pKa = 8.2-8.3). Debido a esto es poco probable que a pH 7.4 estos residuos se encuentren en la forma de tiolato y puedan participar en el IET. Sin embargo, el pKa de la Cys83 presente en la Fe-SODB resultó ser dos unidades de pH menor que el obtenido para el resto de las cisteínas. Este resultado puede explicarse por la presencia en el entorno de la Cys83 de dos residuos cargados positivamente (Lys188 y Arg192 a 5.5 y 8.2 Å respectivamente). Por tanto, la Cys83 podría encontrarse parcialmente en la forma de tiolato a pH 7.4 y participar en el IET, lo cual se comprobará experimentalmente más adelante. Dado que la Tyr35 se encuentra a 20 Å de la Cys83, la reparación del radical tirosilo debería ocurrir a través de otros residuos redox-



sensibles que actúen de intermediarios (del inglés: stepping stones), por ejemplo el Trp9 y el Trp79<sup>(286, 287)</sup>. Para dilucidar si dicha vía (u otras) era posible se realizó una simulación colocando la Tyr35 como radical y la Cys83 como tiolato. Al computar las posibles vías de IET resultó que la más probable contenía al Trp79 y la His32 como stepping stones (figura 32 B). La presencia de residuos aromáticos a lo largo de la vía del IET (Trp79 y Trp9, ausentes en la Fe-SODA) podría adicionalmente aumentar la velocidad del IET<sup>(288, 289)</sup>. En suma, los resultados in silico sugieren que la Cys83 podría participar como dador de electrones y reparar, a través de un mecanismo de IET, al radical tirosilo en la Tyr35 y prevenir la nitración e inactivación en la Fe-SODB.

**Figura 32.** Rol de las cisteínas expuestas al solvente en la resistencia de la Fe-SODB al peroxinitrito y mecanismo propuesto de IET. A. La Fe-SODB y Fe-SODB pre-incubada con NEM (8 μM) se expusieron a peroxinitrito (0-2000 μM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4). La actividad SOD residual se midió como se describe en "Materiales y métodos" y se expresa como porcentaje relativo al control en ausencia de peroxinitrito (100 % de actividad). Se muestra la media ± SEM de n = 3. B. Camino de IET entre el Cys83-S<sup>-</sup> y el Tyr35-O<sup>•</sup> predicho por simulación de dinámica molecular. Se muestra el átomo de Fe en rosado, la primera esfera de coordinación en líneas finas y los residuos relevantes para el IET en líneas gruesas y etiquetados. La estructura secundaria de la Fe-SODB se muestra en negro y el camino de IET en naranja.

# Detección del Cys83-S<sup>•</sup> luego de la reacción de la Fe-SODB con peroxinitrito

Si la Cys83 realmente participaba en el mecanismo de IET, entonces debíamos de ser capaces de detectar el Cys83-S<sup>•</sup> que se produce a consecuencia del mismo. Para ello, se expuso a la Fe-SODB sin tratar (50  $\mu$ M) o tratada previamente con NEM a peroxinitrito (0-20  $\mu$ M) en la presencia del atrapador de radicales (del ingés: *spin trap*) DMPO (100 mM).



Es importante aclarar que se utilizaron concentraciones altas de enzima para minimizar la homólisis del peroxinitrito, la cual podría generar el Cys83-S<sup>•</sup> por mecanismos IET-independientes. Luego de la reacción los aductos DMPO-nitrona en la proteína se detectaron mediante Western blot utilizando el anticuerpo anti-DMPOnitrona<sup>(260, 277)</sup>. Los resultados mostraron que la señal en la condición control se inhibe significativamente cuando la enzima se trata con NEM, lo cual sugiere que el peroxinitrito es capaz de generar un Cys-S<sup>•</sup> (figura 33). Además, cuando se trató la enzima con peroxinitrito en presencia de DMPO y se analizó la muestra por electroforesis en dos dimensiones, se observó la aparición de un nuevo spot a pl más básicos (pl = 7.8), lo cual se puede deber a la formación del aducto Fe-SODB-DMPO (figura 33 B).

**Figura 33. Detección de radicales tiílo en la Fe-SODB expuesta a peroxinitrito. A.** Fe-SODB control (-NEM) o pre-incubada con el agente bloqueante de tioles NEM (+NEM) (50  $\mu$ M) se expusieron a peroxinitrito (0-20  $\mu$ M) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) en la presencia del *spin trap* DMPO (100 mM). Las muestras se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos anti-DMPO (verde) y anti-Fe-SODB (rojo) como control de carga. Las bandas superpuestas se visualizan en amarillo (merge). **B.** La enzima (8  $\mu$ M) se trató con peroxinitrito (300  $\mu$ M) en buffer fosfato (200 mM, pH 7.4) en presencia o ausencia de DMPO (100 mM). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en dos dimensiones como se describe en "Materiales y métodos".

Por otro lado, se utilizó la técnica de EPR para detectar la presencia del Cys83-S<sup>•</sup> utilizando el *spin trap* PBN. Se incubó la enzima (2 mM) con peroxinitrito (500 μM) y PBN (50 mM) de forma de favorecer la reacción directa del oxidante con la Fe-SODB y que ocurriese el IET. El espectro registrado como resultado de dicho experimento posee características de un aducto inmovilizado lo cual indica la presencia de radicales en la proteína (figura 34 A). Para poder dilucidar la identidad de dicho radical, rápidamente se hidrolizó la muestra con la proteasa pronasa y se volvió a analizar, observando la aparición de un espectro característico de aductos PBN-radical tiílo (figura 34 B)<sup>(290-292)</sup>. Para confirmar que el radical observado correspondía a la Cys83, generamos el mutante C83S donde sustituimos la Cys83 por una serina. Al realizar el mismo experimento de EPR utilizando esta enzima, la señal registrada previamente se inhibió casi completamente (figura 34 C y D) confirmando que su origen era la formación del Cys83-S<sup>•</sup>.



**Figura 34. Espectros de EPR de la Fe-SODB expuesta a peroxinitrito en presencia de PBN.** Los espectros se obtuvieron luego de la exposición de la enzima (2 mM) en presencia de PBN (50 mM) a peroxinitrito (500  $\mu$ M) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4). Las condiciones instrumentales fueron *microwave power* 20 mWatts, *modulation amplitud* 1.0 G, *time constant* 164 ms y *gain* 5 x 10<sup>5</sup>. **A.** Fe-SODB nativa (WT). **B.** Fe-SODB nativa (WT) tratada con pronasa (20 mg/mL por 10 min). **C.** Fe-SODB nativa (WT) en ausencia de peroxinitrito. **D.** Fe-SODB-C83S. **E.** Fe-SODB-C83S tratada con pronasa (20 mg/mL por 10 min).

#### Rol de la Cys83 en la inhibición de la nitración de la Tyr35

Para confirmar la hipótesis de que la resistencia observada en la Fe-SODB se debía a un mecanismo de IET, se generaron mutantes en las cisteínas de la Fe-SODB. Nuestra primera candidata como dador de electrones era la Cys159 ya que encuentra a 9.9 Å del átomo de Fe y no se encuentra en la Fe-SODA. Sin embargo, la mutación C159S no afectó la resistencia de la Fe-SODB al peroxinitrito (figura 35 B). Luego se probó con la mutación C83S, la cual sí tuvo un efecto en la susceptibilidad (figura 35 C). Es más, la modificación del entorno positivo de la Cys83 en la doble mutante N187D/K189E también tuvo un efecto en la disminución de la resistencia, debido posiblemente a un aumento en el pKa de la Cys83 (figura 35 D) e inhibición de la transferencia de electrones. Estos resultados demuestran que la Cys83 participa en el mecanismo de resistencia a la inactivación en la Fe-SODB.



Figura 35. Mutantes de la Fe-SODB. La enzima nativa (A, WT) o mutada (B, C159S; C C83S; D, N187D/K189E) (8 μM) se expusieron а peroxinitrito (0-1200  $\mu M)$  en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4). La actividad SOD residual se midió como se describe en "Materiales y métodos" y se expresa como porcentaje relativo al control en ausencia de peroxinitrito (100 % de actividad). Se muestra la media ± SEM de n = 3. En C la Fe-SODB-C83S se expuso a peroxinitrito en ausencia o presencia de L-cisteína metil éster (8 μM, pKa 6.5).

Sin embargo, la Cys83 podría estar previniendo la nitración no sólo mediante un mecanismo de IET sino debido a su reacción directa con el  ${}^{\circ}NO_2$  generado a partir del peroxinitrito ( $k {}^{\circ}NO_2$ -GSH = 2 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y  $k {}^{\circ}NO_2$ -Cys = 5 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)<sup>(166, 256)</sup>. Para descartar esta posibilidad, se expuso la enzima mutada C83S a peroxinitrito en presencia y ausencia de L-cisteína metil éster (8 µM; pKa ~6.7). Si la protección se debía a una reacción directa entre la Cys83 y el  ${}^{\circ}NO_2$ , entonces el agregado de L-cisteína metil éster debería de recuperar la resistencia perdida en la Fe-SODB-C83S. En la **figura 35 C** se observa que el agregado del compuesto no protegió de la inactivación, sugiriendo fuertemente que la protección observada en la enzima WT se debe a un mecanismo de IET entre la Cys83 y la Tyr35. Es importante notar que, aunque la mutación C83S le confiere a la Fe-SODB una mayor susceptibilidad al peroxinitrito, sigue siendo más resistente que la Fe-SODA. Esto sugiere que otros residuos podrían estar participando en la reparación del Tyr35-O<sup>•</sup> a través de caminos de IET alternativos.

#### Rol de la T(SH)<sub>2</sub> en la reducción del radical Cys83-S<sup>•</sup>

T. cruzi contiene una alta concentración de tioles de bajo peso molecular (2.4 ± 0.4 mM en epimastigotas)<sup>(196)</sup> entre los cuales el más abundante es la T(SH)<sub>2</sub> (0.8-2.1 mM en epimastigotas, 0.5 mM en tripomastigotas y 0.12 mM en amastigotas)<sup>(60, 194-196)</sup>. Debido a esto se planteó la posibilidad de que este compuesto pudiese actuar in vivo reduciendo el Cys83-S<sup>•</sup> que se forma en la Fe-SODB expuesta a peroxinitrito. Para investigar esta hipótesis se realizaron experimentos de EPR utilizando las enzimas recombinantes Fe-SODB y Fe-SODB-C83S. La exposición de la enzima nativa al peroxinitrito derivó en la aparición de una señal inmovilizada, que desaparece cuando se utiliza la enizma mutada (Figura 36). Esto demuestra nuevamente que el residuo implicado en la señal es la Cys83. El agregado de T(SH)<sub>2</sub> a la enzima nativa previo al tratamiento disminuye significativamente la señal lo cual implica que este compuesto reduce la cantidad de Cys83-S<sup>•</sup> en la Fe-SODB (Figura 36). Esta disminución podría deberse a que la T(SH)<sub>2</sub> reacciona directamente con el ONOO<sup>-</sup> (k = 7.2x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)<sup>(199)</sup>. Sin embargo, teniendo en cuanta las concentraciones utilizadas y la constante de reacción de la Fe-SODB con peroxinitrito ( $k = 4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), aún en la condición de mayor concentración de T(SH)<sub>2</sub> el porcentaje esperado de disminución de la señal por esta vía es muy bajo comparado al observado (7.7 % y 83 % respectivamente) (Figura 36). Este resultado indica que la  $T(SH)_2$  disminuye la señal de EPR debido a que reduce el Cys83-S<sup>•</sup> y no debido a que reacciona directamente con el ONOO<sup>-</sup>. Es importante mencionar que en nuestras condiciones experimentales se espera una homólisis del peroxinitrito menor del 1 % ( $k = 0.9 \text{ s}^{-1}$ )<sup>(151)</sup>.



**Figura 36. La T(SH)**<sub>2</sub> reduce al radical Cys83-**S**<sup>•</sup>. Los espectros de EPR se registraron a temperatura ambiente (25°C) en el equipo Bruker EMX inmediatamente después del tratamiento. La Fe-SODB nativa o la Fe-SODB-C83S (2 mM) se incubaron con el atrapador de radicales PBN (50 mM) y se expusieron a peroxinitrito (500  $\mu$ M). En algunos casos se adicionó T(SH)<sub>2</sub> (0-1 mM) previo a la exposición. Escala: 20000 UA de intensidad de la señal.

# Modificaciones en la Fe-SODA en parásitos expuestos a condiciones de estrés nitroxidativo

Dados los resultados obtenidos con las enzimas recombinantes, se decidió estudiar en la forma epimastigota de los parásitos las modificaciones existentes en las enzimas al exponer a los mismos a diferentes condiciones de estrés nitroxidativo. Para ello se utilizaron parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODA ya caracterizados y disponibles en el laboratorio<sup>(60, 264)</sup>, los cuales inducen la expresión enzimática luego del agregado de tetraciclina. Los parásitos se incubaron con el inhibidor mitocondrial AA y un dador de 'NO de forma de producir peroxinitrito específicamente en la mitocondria<sup>(163)</sup>. Luego del tratamiento, los extractos proteicos celulares se analizaron mediante electroforesis en dos dimensiones y Western blot, lo cual reveló un corrimiento importante de la Fe-SODA hacia la zona de pl más ácidos en los parásitos con bolos de peroxinitrito (figura 37 A), de forma similar al cambio observado previamente en la Fe-SODB no se modificó significativamente en ninguna de las condiciones utilizadas, en concordancia con la mayor resistencia observada en la Fe-SODB recombinante hacia el peroxinitrito.



Figura Detección de modificaciones 37. nitroxidativas en la Fe-SODA en epimastigotas. A. Epimastigotas sobrexpresantes de la Fe-SODA se trataron con AA (5 µM) y NOC-12 (5 mM); SIN-1 (5 mM) o ONOO- (300  $\mu$ M) durante 3 h a temperatura ambiente. Luego del tratamiento las muestras se procesaron como se describe en "Materiales y métodos". Las membranas se revelaron con anticuerpos anti-Fe-SODA y anti-Fe-SODB. B. Epimastigotas se trataron como se describe en A y los extractos se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo anti-3-NT (anti-NO<sub>2</sub>Y). C. Los extractos de epimastigotas tratados como en A se incubaron toda la noche a 4ºC en presencia del anticuerpo antic-Myc y una matriz de agarosa ligada a proteína A/G. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante Western blot utilizando los anticuerpos anti-c-Myc y anti-3-nitrotirosina (anti-NO<sub>2</sub>Y).

Por otro lado, las modificaciones observadas en la Fe-SODA en los parásitos tratados correlacionan con la nitración de proteínas (figura 37 B).

Tanto el tratamiento con AA/<sup>•</sup>NO (flujos de peroxinitrito endógeno) como con el dador de peroxinitrito SIN-1 (flujos de peroxinitrito endógeno y exógeno) causó un aumento en la nitración total de tirosinas y, más importante aún, la inmunoprecipitación de la Fe-SODA reveló que esta enzima se encuentra nitrada en los parásitos expuestos a SIN-1 (figura 37 C). Estos resultados confirman que la Fe-SODA se nitra y modifica en parásitos expuestos a condiciones de estrés nitroxidativo mientras que la Fe-SODB es resistente a dichas modificaciones.

# Discusión y conclusiones

En este capítulo se purificaron las enzimas Fe-SODA y Fe-SODB de *T. cruzi*, las cuales poseen actividad específica y constantes de dismutación comparables a otras Mn-SODs y Fe-SODs. De forma similar, ambas enzimas reaccionaron con peroxinitrito **(tabla 5)**<sup>(175, 260, 266)</sup>, se inactivaron y se nitraron **(figura 26)**. El análisis de las proteínas expuestas a peroxinitrito mediante espectrometría de masa reveló que la inactivación se debe a la nitración de la Tyr35 cercana al Fe del sitio activo **(figura 28 y tabla 6)**, igual que como ocurre en la Mn-SOD y en las Fe-SODs de *E. coli*<sup>(175, 176)</sup>. Mediante el uso de diferentes estrategias se pudo dilucidar que la nitración se debe a la reacción directa del ONOO<sup>-</sup> con el metal del sitio activo **(figura 27 y 32 y tabla 5)**. El mecanismo más probable implica la formación de un aducto entre el Fe y el peroxinitrito (SOD-Fe<sup>III</sup>-ONOO) el cual homoliza y genera **\***NO<sub>2</sub> y el complejo oxo-metálico correspondiente (SOD-Fe<sup>IV</sup>=O). Este complejo es una especie altamente oxidante que promueve la formación del radical en la tirosina 35 (Tyr35-O\*), la cual rápidamente se combina con el **\***NO<sub>2</sub> conduciendo a la nitración del aminoácido **(esquema 1)**.



**Esquema 1. Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de las Fe-SODs con peroxinitrito.** ONOO<sup>-</sup> (80 % del total de peroxinitrito a pH 7.4) reacciona con el átomo de Fe<sup>III</sup> en las Fe-SODs (reacción *I*). El complejo SOD-Fe<sup>IV</sup>=O oxida a la Tyr35 (reacción *II*) formando el Tyr35-O<sup>•</sup> que se combina rápidamente con el •NO<sub>2</sub> (reacción *III*) conduciendo a la nitración e inactivación de la enzima. En la Fe-SODB, la Cys83 repara el Tyr35-O<sup>•</sup> mediante un mecanismo de IET (reacción *IV*). La homólisis del ONOOH (reacción *V*) y la reacción entre el ONOO<sup>-</sup> y el CO<sub>2</sub> (reacción VI) compiten con la reacción *I* disminuyendo la nitración.

Una vez que la Tyr35 se nitra, la dismutación del O<sub>2</sub><sup>--</sup> se ve impedida ya sea por el efecto estérico del grupo nitro como por repulsión electroestática del fenolato, de manera análoga a lo reportado para la Mn-SOD<sup>(293)</sup>. Aunque ambas enzimas se inactivan por peroxinitrito, resultó llamativa la gran resistencia de la isoforma citosólica, Fe-SODB **(figura 26)**. Para investigar el origen de esta diferencia en la susceptibilidad se cristalizó y resolvió la estructura de la Fe-SODA. El análisis estructural comparativo entre ambas enzimas mostró que dos triptófanos (Trp9 y Trp79) y dos cisteínas (Cys83 y Cys159) presentes en la Fe-SODB no se encontraban en la Fe-SODA **(figura 30)**. Estudios previos mostraron que la

presencia de cisteínas cercanas a tirosinas pueden desencadenar un mecanismo de IET durante eventos oxidativos, generando en la cisteína un radical tiílo (Cys-S<sup>•</sup>)<sup>(280)</sup>. Estos estudios condujeron a plantear la hipótesis de que alguna de las Cys ausentes en la Fe-SODA podría estar reparando el Tyr35-O<sup>•</sup> y previniendo la nitración. De las tres cisteínas presentes en la Fe-SODB solamente la Cys83, que se encuentra a 22 Å de la Tyr35, posee un pKa teórico que favorece la transferencia de electrones<sup>(280)</sup>. El análisis de MD confirmó que dicho mecanismo es posible y que el Trp79 y la His32 actuarían de puente durante la transferencia (figura 32 B). Al igual que ocurre en la mioglobina y la hemoglobina, el mecanismo de IET culmina en la formación de un radical tiílo, en este caso en la Cys83<sup>(260,</sup> <sup>277, 281)</sup> (figura 33 y 34). La mutación C83S en la Fe-SODB aumentó la sensibilidad hacia el peroxinitrito (figura 35 C), aunque aún sigue siendo más resistente que la Fe-SODA. Este resultado sugiere que otros aminoácidos además de la Cys83 podrían estar participando en la reparación del Tyr35-O\*. Por otro lado, el Cys83-S\* podría ser reducido en el parásito por reductores de bajo peso molecular abundantes en el citosol, como ser la T(SH)2, el GSH o el ascorbato. Esto se estudió para el caso de la T(SH)2, mayor tiol de bajo peso molecular en T. cruzi. Mediante estudios de EPR se observó que, a concentraciones fisiológicas, la T(SH)<sub>2</sub> es capaz de reducir al Cys83-S<sup>•</sup> de forma significativa, lo cual permitiría que la Fe-SODB pudiese reaccionar con más de una molécula de ONOO<sup>-</sup> sin ser inactivada in vivo (figura 36). Por último, se evaluó la presencia de modificaciones nitroxidativas en las Fe-SODs en el parásito expuesto a flujos de peroxinitrito exógeno y/o endógeno. Se logró detectar a la Fe-SODA nitrada en los parásitos incubados con SIN-1 o AA/•NO. Además, sólo se observaron modificaciones en esta isoforma (figura 37), en concordancia con los resultados obtenidos con las enzimas recombinantes expuestas a peroxinitrito. La inactivación de la Fe-SODA mediada por peroxinitrito podría aumentar los niveles de O<sub>2</sub>•intramitocondrial, el cual es una señal pro-apoptótica en T. cruzi<sup>(60, 227)</sup>. Por otro lado, la resistencia a la inactivación observada en la Fe-SODB condujo a plantearnos la hipótesis de que esta enzima podría ser importante para la detoxificación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durante la fagocitosis. En este sentido, la inactivación por peroxinitrito de la Fe-SODB no permitiría la supervivencia del parásito dentro del macrófago. En el capítulo siguiente se explorará el rol de las Fe-SODs en infecciones experimentales in vitro e in vivo.

# **CAPÍTULO 2**

# Contribución de la Fe-SODB a la virulencia de *T. cruzi in vitro* e *in vivo*

## Resumen

Durante la fagocitosis de *T. cruzi* se ensambla y activa la NOX-2 la cual produce grandes cantidades de  $O_2^{\bullet}$  hacia el parásito internalizado. A pH ácido, el  $O_2^{\bullet}$  se protona y forma  $HO_2^{\bullet}$  (pKa = 4.88), el cual posee mayor permeabilidad de membrana y podría ejercer acciones tóxicas directas o indirectas dentro del parásito. En este capítulo se construyó, utilizando datos experimentales y reportados en la literatura, un modelo cinético que involucra a dichas especies durante los primeros minutos del proceso de fagocitosis. Los datos obtenidos a partir de este modelo sugieren que la Fe-SOD citosólica, Fe-SODB, podría cumplir un rol en la detoxificación del  $O_2^{\bullet}$  generado durante la fagocitosis y será objeto de estudio de este capítulo tanto *in vitro* como *in vivo*. A su vez, en condiciones pro-inflamatorias, se produce \*NO a consecuencia de la inducción de la iNOS. El \*NO es capaz de inhibir la cadena respiratoria del parásito y aumentar la producción de  $O_2^{\bullet-}$  mitocondrial. En estas condiciones se espera que una sobrexpresión de la Fe-SODA detoxifique a dicho radical en este organelo y será también estudiado en este capítulo.

#### Resultados clave

- Se generó una línea de parásitos sobrexpresantes estables de la Fe-SODB utilizando el plásmido pRIBOTEX, el cual se integra en el genoma del parásito.
- La sobrexpresión de la Fe-SODB en *T. cruzi* disminuye la generación de peroxinitrito dentro del parásito durante la invasión a macrófagos y aumenta los índices de infección en estas células.
- La sobrexpresión de la Fe-SODA no aumenta la infectividad en macrófagos control pero sí en condiciones de producción de \*NO, sugiriendo que esta enzima cumple un rol en la detoxificación del O2\* mitocondrial pero no del proveniente de la NOX-2.
- Para determinar si el par O2<sup>•-</sup>/HO2<sup>•</sup> es capaz de ejercer alguna acción dentro del parásito se midió la velocidad de consumo de O2 por fagosoma y el pH fagosomal durante la fagocitosis de *T. cruzi* en macrófagos. Estos datos, junto con otros ya reportados, se utilizaron para calcular las concentraciones de O2<sup>•-</sup> y HO2<sup>•</sup> en estado estacionario y el flujo de ambas especies hacia el parásito. Además se comprobó la entrada de ambos experimentalmente, tanto utilizando la sonda dihidroetidio (DHE) como midiendo la actividad aconitasa, la cual se protegió en los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB.
- La detección de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dentro del parásito es menor cuando se inhibe la acidificación del fagosoma, lo cual tiene sentido ya que las permeabilidades del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y HO<sub>2</sub><sup>•</sup> son significativamente diferentes.
- La detección de O2<sup>•-</sup> dentro del parásito es menor cuando se inhiben los canales aniónicos, sugiriendo que el O2<sup>•-</sup> podría utilizarlos.
- Por último, la sobrexpresión de la Fe-SODB confirió a los parásitos una mayor virulencia en infecciones experimentales en ratones.

# Materiales y métodos

### Parásitos y macrófagos

Los epimastigotas WT de *T. cruzi* (CL-Brener y Dm28c) se cultivaron a 28°C en medio BHI como se describió previamente<sup>(294)</sup>. Las cepas transfectadas se mantuvieron bajo las mismas condiciones pero se suplementó el medio con el antibiótico de resistencia G418 (200 µg/mL, Sigma). La transformación *in vitro* a la forma tripomastigota metacíclico se realizó bajo condiciones previamente definidas<sup>(295)</sup> de deficiencia de nutrientes durante 96 h. Los tripomastigotas derivados de cultivo celular se obtuvieron del sobrenadante de células Vero previamente infectadas (cedidas amablemente por la Dra. Dolores Piñeyro). Las cepas de *T. cruzi* CL-Brener y CL-Brener transfectadas con el plásmido pTcINDEX-9E10-Fe-SODA fueron cedidas por el Dr. Shane Wilkinson. La expresión de la Fe-SODA se indujo con la tetraciclina presente en el suero bovino fetal (SBF) utilizado, el cual produce un aumento de ~3 veces la cantidad de proteína. La cepa Dm28c fue cedida por la Dra. Dolores Piñeyro.

La línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC-TIB-67) se cultivó a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado con penicilina (0.1 g/L), estreptomicina (0.1 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (1.8 g/L) y 10 % de SBF. Los cultivos primarios de macrófagos derivados de médula ósea se realizaron como se describió previamente<sup>(296)</sup> a partir de fémures de ratones C57BL/6 WT y C57BL/6 gp91-*phox*<sup>-/-</sup> (Jackson Laboratory, JAX stock #002365). Para estimular la diferenciación a macrófagos se utilizó el medio RPMI (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute medium*, Sigma) suplementado con 10 % SBF y 30 % v/v del sobrenadante de células confluentes L929, las cuales secretan el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).

#### Generación de parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB

La secuencia codificante de la Fe-SODB fue amplificada y clonada en el vector pGem-T easy (Pro-mega) como se reportó previamente<sup>(98)</sup>. El inserto que contiene a la secuencia de la Fe-SODB se obtuvo por digestión del plásmido pGem-T-Fe-SODB utilizando las enzimas de restricción BamHI y HindIII. El inserto se purificó a partir de un gel de agarosa (kit "GFX PCR DNA and gel band purification" de GE) y ligado (T4-DNA ligasa, Fermentas) al vector pRIBOTEX previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Se utilizó este plásmido ya que se integra en el genoma nuclear de T. cruzi<sup>(297)</sup>. La construcción pRIBOTEX-Fe-SODB se purificó a partir de células de E. coli XL1 blue mediante lisis alcalina y fue secuenciado previo a la transfección, la cual se realizó como se describió previamente<sup>(249)</sup>. En forma resumida, epimastigotas Dm28c en fase exponencial de crecimiento (5 x  $10^7$ parásitos/mL) se lavaron y resuspendieron en HBS (Hepes 21 mM; NaCl, 137 mM; KCl, 5 mM; glucosa, 6 mM, pH 7.4). El plásmido pRIBOTEX-Fe-SODB (100 μg) se agregó a 400 μL de dicha suspensión en una cubeta de electroporación y se transfectaron las células mediante dos pulsos de 450 V, 50  $\mu$ F y 25  $\Omega$  utilizando el electroporador ECM 630 Electro Cell Manipulator (BTX) System. Las células transfectadas se resuspendieron en 10 mL de BHI y 24 h después se adicionó G418 en concentraciones crecientes hasta alcanzar los 500 µg/mL. La confirmación de la sobrexpresión de la Fe-SODB se realizó mediante Western blot utilizando el anticuerpo de conejo anti-Fe-SODB disponible en el laboratorio<sup>(98)</sup>. Luego
67

del proceso de selección las células sobrexpresantes se mantuvieron en medio BHI suplementado con 10 % de SBF y G418 (200 µg/mL).

## Western blot y estimación de la concentración de Fe-SODs en *T. cruzi*

Se obtuvieron los extractos proteicos totales de T. cruzi a partir de 6 x 10<sup>8</sup> parásitos/mL mediante lisis en buffer de carga (Tris/HCl, 30 mM; pH 6.8; SDS, 1 % m/v; glicerol, 5 % v/v; y azul de bromofenol, 0.005 % m/v). Dichos extractos (50 μg) y, en algunos casos, diferentes cantidades (0.05-1 µg) de las enzimas recombinantes Fe-SODA y Fe-SODB (producidas como previamente)<sup>(98)</sup> se analizaron por electroforesis y Western blot. Luego de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con rojo Ponceau (Applichem) como control de carga y se normalizaron utilizando el software ImageJ. Las membranas se bloquearon con BSA 5 % m/v (Sigma) en buffer PBS durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Según el experimento, las membranas se revelaron utilizando los anticuerpos de conejo específicos para: Fe-SODA, Fe-SODB, MPX, CPX, TXN-1, TXN-2 o TS (1/2000 en PBS; Tween-20, 0.1 % v/v; y BSA 5 % m/v). Las membranas se visualizaron utilizando los anticuerpos secundarios IRDye 800CW y/o IRDye 680RD (1/15000 en PBS; Tween-20, 0.1 % v/v), y el sistema de adquisición de imágenes mediante detección de fluorescencia en el infrarrojo cercano Odyssey (LI-COR). Las imágenes se analizaron mediante el software Image Studio. Para la estimación de la concentración de Fe-SODs se interpoló el valor de fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIR) correspondiente a 1.5 x 10<sup>7</sup> parásitos en la curva de calibración generada con las enzimas recombinantes (0.05-1 µg). La cantidad de Fe-SOD por parásito se convirtió a concentración utilizando las masas moleculares de las proteínas (obtenidas con la herramienta ExPASy ProtParam) y los volúmenes correspondientes a las formas epimastigota y tripomastigota, según el caso (28.1 ± 1.5 y 10.7 ± 0.7 fL respectivamente). Los volúmenes celulares se estimaron utilizando diferentes formas geométricas a partir de micrografías de los parásitos fijados con formaldehído y observados en microscopio óptico con aumento 1000x (Nikon Ecplise TE 200). En el caso de la forma epimastigota, un cono y media elipsoide se utilizaron para estimar el cuerpo de la célula y un cono extra para estimar el volumen de la cola. En el caso de la forma tripomastigota, se utilizaron dos conos y un cilindro trapezoide. Los resultados obtenidos corresponden a la media ± SEM de 25 determinaciones y coinciden con valores ya existentes en la literatura<sup>(86)</sup>.

### Inmunocitoquímica

Epimastigotas y tripomastigotas (1 x 10<sup>8</sup>) se lavaron con PBS y se incubaron toda la noche en solución de fijación fresca (buffer fosfato NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M, pH 7.4; paraformaldehído, 4 % v/v) a 4°C y en agitación. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 15 min en solución de permeabilización (PBS; Tween-20, 0.5 % v/v). Luego, los parásitos se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo de conejo anti-Fe-SODB (1/50 en solución de permeabilización) durante toda la noche, a 4°C y en agitación y, con el anticuerpo secundario Alexa-488 anti-IgG de conejo (1/1000 en solución de permeabilización, Invitrogen) durante 90 min a temperatura ambiente y en agitación. El DNA de los parásitos se tiñó con el fluoróforo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 5 µg/mL) durante 15 min a temperatura ambiente. Los parásitos se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Ecplise TE 200).

# Actividad SOD

La actividad SOD en *T. cruzi* fue evaluada espectrofotométricamente y mediante geles de actividad. En el primer caso, se utilizó el ensayo de reducción del cyt c como se describió previamente<sup>(87, 298, 299)</sup>. Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de proteína necesaria para inhibir en un 50 % la reducción del cyt c<sup>3+</sup> (pendiente en ausencia de SOD ~ 0.025 UA<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>) y se determina a partir del gráfico 1/pendiente en función del volumen de SOD (µL) adicionado a una cubeta de 1 mL<sup>(267)</sup>. Los extractos solubles de *T. cruzi* se prepararon lavando 4.0 x 10<sup>8</sup> epimastigotas con PBS y re-suspendiéndolos en 0.5 mL de buffer de lisis hipotónico (PBS, diluido 1/10 en H<sub>2</sub>O). La lisis se realizó mediante 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento (1 min a 100°C y 1 min en nitrógeno líquido). El material remanente se centrifugó a 14000 g y 4°C durante 15 min y el sobrenadante se utilizó para medir la actividad SOD. El contenido proteico se midió mediante el ensayo del ácido biciconínico (Sigma).

La actividad SOD en gel se midió como se describió anteriormente<sup>(300)</sup>. Brevemente, se prepararon extractos solubles de *T. cruzi* de la misma manera que para el ensayo espectrofotométrico y se analizaron (45µL de extracto) en geles nativos de poliacrilamida (10 %) a 4°C. La actividad SOD se midió sumergiendo los geles en una solución con nitro blue tetrazolium (NBT, 0.25 mg/mL) y riboflavina (0.1 mg/mL) durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Los geles luego se lavaron y revelaron con tetrametiletilendiamina (TEMED, 1/100) y exposición a la luz hasta obtener un contraste óptimo entre las zonas acromáticas y el fondo color violeta. En paralelo y bajo las mismas condiciones, por cada experimento se corrió un gel teñido con Coomasie blue como control de carga.

## Detección de peroxinitrito dentro del parásito

El peroxinitrito formado dentro del parásito se detectó utilizando la sonda boronato de fluoresceína (FL-B) sintetizada en el laboratorio<sup>(301)</sup>, la cual genera un producto fluorescente al reaccionar con el oxidante. Epimastigotas (1 x 10<sup>8</sup>) o tripomastigotas derivados de cultivo celular (1.3 x 10<sup>7</sup>) se incubaron con FL-B (100 µM) durante 30 min. El exceso de sonda se quitó mediante tres lavados con dPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.45 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucose, 1 mM L-arginine).

# Exposición de T. cruzi a SIN-1

Epimastigotas (1 x 10<sup>8</sup>) pre-cargados con la sonda FL-B se incubaron durante diferentes tiempos (10-30 min) en ausencia o presencia de SIN-1 (0.1 mM, Sigma) a 28°C. La oxidación de la FL-B se evaluó mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur).

## Exposición de T. cruzi a peroxinitrito derivado del macrófago

Macrófagos J774A.1 fueron estimulados con IFN- $\gamma$  (800 U/mL, Sigma) y LPS (16 µg/mL, Sigma) durante 5 h para la inducción de la iNOS<sup>(146)</sup>. La activación de la NOX-2 ocurre durante la infección<sup>(22, 302, 303)</sup>. En algunos casos, previo a la infección, se adicionó N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 10 mM, Sigma) al medio de cultivo para inhibir la iNOS. Los macrófagos se lavaron dos veces con PBS y se infectaron con tripomastigotas pre-cargados con FL-B (relación parásito:célula de 5:1) durante 2 h a 37°C. La oxidación de la FL-B en el parásito se visualizó utilizando un microscopio de fluorescencia (aumento 400x, Nikon Eclipse TE-200). Adicionalmente, las células se recolectaron mecánicamente y fueron analizadas por citometría de flujo (BD FACSCalibur).

## Invasión e infectividad de T. cruzi en macrófagos in vitro

Los macrófagos (J774A.1 o derivados de médula ósea) se incubaron durante 5 h en ausencia o presencia de inductores de la iNOS previo a la infección con tripomastigotas como se describió en el apartado anterior. Luego de 2 h, los parásitos no internalizados se removieron mediante tres lavados con PBS y los macrófagos se analizaron inmediatamente (invasión) o se incubaron durante 24 h (infectividad) en DMEM, 10 % SBF a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Luego de pasado el tiempo correspondiente a cada ensayo los macrófagos se fijaron (PBS; formaldehído, 4 % v/v) durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS tres veces y se permeabilizaron y tiñeron los núcleos con DAPI (PBS; Triton X-100, 0.1 % v/v; DAPI, 5 µg/mL). El porcentaje de invasión y/o infección se evaluó mediante microscopía de fluorescencia con aumento 1000x contando la cantidad de amastigotas cada 100 macrófagos. Los resultados se expresan relativos a la cepa WT.

# Exposición de los parásitos a flujos de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> derivados del sistema XO/X

Flujos controlados de O2<sup>•-</sup> se obtuvieron utilizando el sistema xantina oxidasa/xantina (XO/X, 50 mU/mL y 200  $\mu$ M respectivamente) en PBS y en presencia de catalasa (0.2 mg/mL) durante 40 min. En algunos casos, se adicionó el inhibidor de canales aniónicos ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB, 50  $\mu$ M, Sigma) 15 min antes de la exposición a  $O_2^{\bullet}$ . Bajo estas condiciones se generó un flujo de ~3.1 ± 0.2  $\mu$ M/min de  $O_2^{\bullet}$ , medido con el ensayo de reducción del cyt  $c^{3+}$  ( $\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>(304)</sup>. Previo a los ensayos, los epimastigotas o tripomastigotas (3 x 10<sup>8</sup>/mL) se lavaron con dPBS y se incubaron durante 30 min con la sonda dihidroetidio (DHE, 100 μM Molecular Probes). Luego de la incubación las células se lavaron tres veces con dPBS para remover el exceso de sonda y se expusieron al O2<sup>•-</sup> como se mencionó anteriormente. Luego de la exposición se procedió al tratamiento de la muestra y cuantificación del producto 2-hidroxietidio (2-OH-E<sup>+</sup>) como se describió anteriormente<sup>(305)</sup>. De forma breve, las células se lisaron mecánicamente en PBS y Tritón X-100 (0.1 % v/v) utilizando jeringas (27G x 1/2" 0.4 x 13 mm) y realizando 50 pasajes. La extracción orgánica del DHE y sus productos derivados, junto con la precipitación de proteínas, se realizó adicionando acetonitrilo (ACN, 100 μL) e incubando las muestras a 4ºC durante 30 min. Posteriormente se realizó una centrifugación (20000 g, 30 min, 4°C) y la fase orgánica se removió y secó en un evaporador de vacío (Rapid Vap, LABCONCO) a 40°C, 100 mbar y 40 rpm. Las muestras se re-suspendieron en 20  $\mu$ L de buffer de muestra (90 % H<sub>2</sub>O, 10 % ACN, 0.1 % ácido trifluoroacético, TFA). El DHE y sus productos derivados (2-OH-E<sup>+</sup> y etidio (E<sup>+</sup>)) se separaron mediante HPLC utilizando la columna Supelco Ascentis Express Phenyl-Hexyl (5 cm x 4.6 mm, 2.7  $\mu$ m, Sigma) equilibrada con la fase móvil (65 % H<sub>2</sub>O, 35 % ACN, 0.1 % TFA) y un detector de fluorescencia (Agilent Series 1200). Las muestras eluyeron isocráticamente (flujo de 1 mL/min) y los picos correspondientes al DHE, 2-OH-E<sup>+</sup> y E<sup>+</sup> se monitorearon mediante detección de fluorescencia a una  $\lambda_{ex-em}$ = 510-567 nm. El estándar de 2-OH-E<sup>+</sup> y E<sup>+</sup> se preparó como se describió anteriormente<sup>(306)</sup>.

## Actividad aconitasa

Epimastigotas  $(3.0 \times 10^8)$  se incubaron con el sistema XO/X como se describió en el apartado anterior y posteriormente se lisaron en buffer hipotónico (PBS diluído 1/10). La lisis se realizó mediante 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento (1 min a 100°C y 1 min en nitrógeno líquido). El material remanente se centrifugó a 14000 g y 4°C durante 15 min y el sobrenadante se utilizó para medir la actividad. La actividad aconitasa se evaluó midiendo el consumo de cis-aconitato (100 µM) a 240 nm, 28°C y en buffer Tris/HCl (50 mM, pH 7.4).

## Determinación del pH fagosomal

Para la determinación del pH fagosomal se generaron anticuerpos anti-T. cruzi en conejo conjugados al fluoróforo pH-sensible isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma). Brevemente, epimastigotas (1 x 10<sup>9</sup>) se lisaron en PBS conteniendo digitonina (1 mg/mL) e inhibidores de proteasas (Sigma) durante 15 min en hielo. La muestra se lavó dos veces mediante centrifugación (20000 g, 15 min, 4°C) y el pellet (fracción enriquecida en membrana) se re-suspendió en buffer de re-solubilización (NaCl, 150 mM; Tritón X-100, 1% v/v; deoxicolato, 0.5 % v/v; SDS, 0.1 % m/v; Tris, 50 mM, pH 7.4; inhibidores de proteasas Sigma) durante 20 min a temperatura ambiente. El extracto obtenido se centrifugó (20000 g, 30 min, 4°C) y el sobrenadante se utilizó para la inmunización en conejo (dos dosis de 200 µg). Los anticuerpos se purificaron a partir del suero mediante técnicas convencionales (precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad (sefarosa CL-4B conjugada a proteína A)). La especificidad se evaluó mediante Western blot utilizando BSA (10  $\mu$ g) y extractos proteicos totales de *T. cruzi* y macrófagos J774A.1 (50 μg). El anticuerpo purificado se conjugó al fluoróforo pH-sensible FITC siguiendo las instrucciones del fabricante. La relación entre fluoresceína y proteína se calculó midiendo la absorbancia a 495 nm y 280 nm (Ec. 21) y la concentración de anticuerpo utilizando la Ec. 22.

$$\frac{F}{P} Molar = \frac{2.77 \text{ x Abs 495}}{Abs 280 - (0.35 \text{ x Abs 495})}$$
 Ec. 21

$$IgG\left(\frac{mg}{mL}\right) = \frac{[Abs\ 280 - (0.35\ x\ Abs\ 495)]}{1.4}$$
 Ec. 22

Macrófagos J774A.1 se infectaron con tripomastigotas en presencia del anticuerpo anti-*T. cruzi*-FITC (1 mg/mL) en una relación parásito:célula de 5:1 durante 10 min y a 37°C. Los

parásitos no internalizados se lavaron y las células se incubaron durante 15 min en DMEM a 37°C. Posteriormente, el medio se reemplazó por PBS frío y bafilomicina A-1 (B-A1, 0.15  $\mu$ ), un inhibidor específico de la H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar (V-ATPasa), para frenar la acidificación del fagosoma previo al análisis por microscopía (400x) o citometría de flujo. En ambos casos, trypan blue (0.4 % m/v) se adicionó antes de la medida para apantallar la fluorescencia externa de las células. En algunos casos, B-A1 (0.15 μM) se adicionó a los macrófagos durante 30 min previo a la infección como control positivo. Macrófagos no infectados se utilizaron como control negativo. La curva de calibración se realizó graficando la media de fluorescencia en función del pH del fagosoma y se obtuvo in situ cambiando el medio de los macrófagos infectados por un medio rico en K<sup>+</sup> a diferentes pHs (KCl, 140 mM; glucosa, 5 mM y buffer citrato o fosfato según el pH deseado, 15 mM). Asimismo, se adicionaron los ionóforos de K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> nigericina y valinomicina (10  $\mu$ M). Las células se incubaron durante 5 min, tiempo necesario para que se alcance un equilibrio entre el pH extracelular y fagosomal. Posteriormente, las células se recolectaron y analizaron mediante citometría de flujo. La inhibición de la acidificación del fagosoma debido a la B-A1 se corroboró utilizando partículas de *E. coli* conjugadas al fluoróforo pH-sensible pHRodo (100 µg/mL, Invitrogen). Los fagosomas ácidos se observan como puntos rojos mediante microscopía de fluorescencia (400x). Los efectos de la B-A1 y el difeniliodonio (DPI, 100  $\mu$ M, Sigma) sobre la fagocitosis y la actividad NOX-2 del macrófago luego de 30 min de incubación se evaluaron mediante el ensayo de reducción de NBT<sup>(22, 307)</sup> y mediante el estudio de la invasión parasitaria luego de 2 h de interacción como se explicó anteriormente. En el ensayo de reducción del NBT, los macrófagos infectados se incubaron durante 30 min a 37°C con NBT (1 mg/mL) y la formación de precipitados de formazán en las vacuolas fagocíticas se observaron mediante microscopía óptica (400x).

# Exposición de los parásitos a flujos de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> derivados del macrófago

Tripomastigotas pre-cargados con la sonda DHE (2.9 x 10<sup>7</sup>) se utilizaron para infectar macrófagos J774A.1. Luego de 2 h las células se recolectaron y centrifugaron a 3000 g durante 5 min a temperatura ambiente. En algunos casos, B-A1 (0.15  $\mu$ M, Sigma) o DPI (100  $\mu$ M, Sigma) se agregaron a los macrófagos 30 min antes de la infección para inhibir la H<sup>+</sup>-ATPasa o la NOX-2 respectivamente. Posteriormente se procedió a la lisis de las células, extracción orgánica y análisis por HPLC de las muestras como se describió en el apartado "Exposición de los parásitos a flujos de O<sub>2</sub><sup>•</sup> derivados del sistema XO/X".

# Modelo cinético durante la fase inicial de la fagocitosis de *T. cruzi* en macrófagos

Para construir el modelo cinético del fagosoma del macrófago al inicio de la fagocitosis de *T. cruzi* se consideró que, en estado estacionario, la velocidad de la formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/HO<sub>2</sub><sup>•</sup> iguala a la velocidad de desaparición. La formación de estas especies en el fagosoma se debe a la activación de la NOX-2 y el consumo a la dismutación espontánea. En este caso, la velocidad de difusión de ambas especies hacia fuera del fagosoma puede ser despreciada debido a que es muchísimo menor que la velocidad de dismutación. Para construir el modelo cinético en el citosol de *T. cruzi* se consideró que la velocidad de producción de  $O_2^{\bullet-}$  corresponde a la suma de las velocidades de difusión del  $O_2^{\bullet-}$  y del  $HO_2^{\bullet}$  hacia dentro del parásito, mientras que la velocidad de desaparición corresponde a la velocidad de dismutación catalizada por la Fe-SODB citosólica. En este caso la velocidad de dismutación espontánea y las de reacción entre el  $O_2^{\bullet-}$  y otros blancos celulares son despreciadas debido a la alta concentración de Fe-SODB presente en el citosol y su alta constante de velocidad con el  $O_2^{\bullet-}$  ( $k = 7.6 \pm 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>(98)</sup>.

Para los cálculos, se estimó que al inicio de la fagocitosis el volumen del fagosoma es prácticamente igual al volumen de *T. cruzi*<sup>(22)</sup> mientras que las áreas superficiales del fagosoma y de *T. cruzi* se estimaron a partir de micrografías electrónicas previamente publicadas utilizando el software ImageJ<sup>(6, 15, 22, 54, 55)</sup>. Los datos del fagosoma se estimaron asumiendo una forma elipsoidal mientras que para el caso de *T. cruzi* se utilizó media elipsoide más un cono o, alternativamente, una elipsoide completa dependiendo de cada caso particular.

La actividad NOX-2 se calculó a partir del consumo de  $O_2$  neto. Dicho consumo incluye el consumo por la NOX-2 y la regeneración de  $O_2$  durante la dismutación espontánea del  $O_2^{\bullet-}$  (en una relación estequiométrica de un  $O_2$  cada dos  $O_2^{\bullet-}$ ). Por lo tanto, la velocidad de reacción de la NOX-2 es igual a la velocidad de consumo de  $O_2$  más la mitad de la velocidad de dismutación.

### Velocidad de consumo neta de O<sub>2</sub> por fagosoma

La velocidad de consumo neta de O<sub>2</sub> se calculó como la diferencia entre los valores obtenidos utilizando macrófagos derivados de médula ósea infectados de ratones C57BL/6 WT y de ratones gp91-phox<sup>-/-</sup> utilizando un analizador de O<sub>2</sub> en placa (Seahorse XFe24, Agilent). Brevemente, el consumo basal de O<sub>2</sub> de los macrófagos se midió tres veces a 37°C y en medio de respiración celular (DMEM; glutamina, 2 mM; piruvato, 1 mM; glucosa, 10 mM) utilizando el siguiente programa: 2 min y 30 s de mezclado, 30 s de espera y 2 min de medida previo a la inyección de 75 µL de medio o tripomastigotas opsonizados con el anticuerpo anti-T. cruzi (1.5 mg/mL) en una relación parásito:célula de 40:1. Para los cálculos se tomaron los valores de consumo de O<sub>2</sub> máximos (aproximadamente a los 10-20 min de la inyección). Se asume que a dichos tiempos ya ocurrió la acidificación del fagosoma (primeros 5 min)<sup>(101)</sup> y que el valor obtenido corresponde al pH del fagosoma estimado en este trabajo. El consumo de O2 irá disminuyendo eventualmente a medida que la NOX-2 se inactiva y debido a esto el dato obtenido representa sólo la fase temprana de la fagocitosis. Luego de la medida los parásitos no internalizados se removieron mediante tres lavados con PBS. La velocidad de consumo neta de O<sub>2</sub> por fagosoma se calculó contando en paralelo el número de células en cámara de Neubauer y el número de fagosomas por macrófago mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse TE-200) y tinción con DAPI.

### Velocidad de dismutación espontánea

La velocidad de dismutación espontánea es la suma de tres reacciones, una que involucra dos moléculas de  $O_2^{\bullet-}$ , otra un  $O_2^{\bullet-}$  y un  $HO_2^{\bullet}$  y la tercera dos  $HO_2^{\bullet-}$ . Para calcular las velocidades de dismutación espontánea del par  $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet-}$  en el fagosoma y en el citosol

73

de *T. cruzi*, se utilizaron las tres constantes de reacción independientes de pH reportadas previamente, el pKa del par  $O_2^{\bullet}/HO_2^{\bullet}$  (tabla 9)<sup>(66, 67, 99)</sup> y los valores de pH del fagosoma (medido en este trabajo) y del citosol de *T. cruzi* (pH = 7.1)<sup>(85)</sup>.

### Difusión del par O2<sup>•-</sup>/HO2<sup>•</sup> hacia *T. cruzi*

La velocidad de desaparición del par  $O_2^{\bullet}/HO_2^{\bullet}$  por difusión en el fagosoma se puede calcular como se muestra a continuación **(Ec. 23)**:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_d \times C_f = \frac{J}{V_f} = \frac{P \times A}{V_f} \times 10^{-3} \times (C_f - C_{tc}) \quad \text{Ec. 23}$$

En esta ecuación C<sub>f</sub> y C<sub>tc</sub> son las concentraciones de las especies en el lumen del fagosoma y el citosol de *T. cruzi* respectivamente; k<sub>d</sub> es la constante de difusión; J es el flujo; V<sub>f</sub> es el volumen del fagosoma y P es la constante de permeabilidad de membrana. Dado que el par  $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet}$  es rápidamente consumido por la Fe-SODB citosólica, podemos despreciar el término C<sub>tc</sub> y la **Ec. 23** se simplifica a la **Ec. 24**:

$$k_d = \frac{P \times A}{V_f} \times 10^{-3} \qquad \text{Ec. 24}$$

Utilizando el área superficial estimada previamente de *T. cruzi*, 1.6 x  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>, el volumen del fagosoma, 1.0 x  $10^{-14}$  L y las constantes de permeabilidad reportadas para ambas especies, 2.1 x  $10^{-6}$  cm/s<sup>(82)</sup> y 9 x  $10^{-4}$  cm/s<sup>(90)</sup> para el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y el HO<sub>2</sub>• respectivamente se obtuvieron las k<sub>d</sub> presentadas en la **tabla 10.** Por último, el flujo de O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>/HO<sub>2</sub>• (J<sub>in</sub>) hacia *T. cruzi* y las velocidades de entrada al parásito (dC<sub>tc</sub>/dt) se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones (Ec. 25 y Ec. 26):

$$J_{in} = k_d \times C_{ss} \times V_f$$
 Ec. 25  $\frac{dC_{tc}}{dt} = \frac{J_{in}}{V_{tc}}$  Ec. 26

En estas ecuaciones  $k_d$  corresponde a la constante de difusión,  $C_{ss}$  a la concentración en estado estacionario en el lumen del fagosoma,  $V_f$  al volumen del fagosoma y  $V_{tc}$  al volumen de *T. cruzi*. Los resultados se muestran en la **tabla 10**.

### Evaluación de la virulencia in vivo

Ratones C57BL/6 hembras (10-12 semanas de edad) se inocularon intraperitonealmente (5-6 ratones por grupo) con 5 x  $10^6$ -2 x  $10^7$  tripomastigotas de la cepa WT o sobrexpresante de la Fe-SODB. La infección aguda se evaluó midiendo la parasitemia y la carga parasitaria tisular mediante qPCR. En el primer caso, se contó la cantidad de tripomastigotas en sangre obtenida de la vena de la cola (3 µL) mediante microscopía en 32 campos de cámara de Neubauer (400x de aumento)<sup>(308)</sup>. Para evaluar la carga parasitaria tisular, 10 días post-infección, se sacrificaron los animales y se extrajeron los corazones. Las muestras se lavaron con PBS y se homogeneizaron en DNAzol (1 mL, Invitrogen) utilizando un homogeneizador (5-10 ciclos, Glas-Col). El ADN se purificó a partir del homogeneizado siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza se determinó a partir de la absorbancia a 260 nm y la relación Abs 260/Abs 280 nm. Solamente las muestras que tuvieron una relación mayor o igual a 1.8 fueron utilizadas. El ADN de *T. cruzi* (fragmento

de 195 pares de bases) se cuantificó mediante qPCR en un termociclador (Illumina's Eco Real-Time PCR System) utilizando la sonda SYBR (SYBR Green Master Mix, Applied biosystems) y los primers específicos, AATTATGAATGGCGGGAGTCA (forward) y CCAGTGTGTGAACACGCAAAC (reverse). El ADN de ratón se obtuvo y cuantificó en paralelo de la misma manera pero utilizando primers específicos para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH): CTGAGAACGGGAAGCTTGTC (forward) ٧ CCTGCTTCACCACCTTCTTG (reverse). Cada mezcla de reacción para el ensayo por qPCR (20 μL) se realizó con 10 μL de 2x SYBR Green Supermix, 0.5 μM de cada primer y 100 ng de ADN. El programa de reacción incluyó los siguientes pasos: 1 ciclo a 50°C (10 min); 1 ciclo a 94°C (3 min); 40 ciclos a 94°C (45 s), 68°C (1 min) y 72°C (1 min); y 1 ciclo a 72°C (10 min). Luego de la amplificación se realizó una curva de *melting* midiendo la fluorescencia entre 95 y 55°C como control de especificidad de la técnica. El aumento en la cantidad de ADN de T. cruzi en los corazones de los ratones infectados con los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB con respecto a la cepa WT (Fold change) se calculó como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct$ representa la diferencia entre el valor Ct de *T. cruzi* y GAPDH y ΔΔCt representa la diferencia entre el  $\Delta$ Ct de los parásitos sobrexpresantes y los parásitos WT.

## Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM y se analizaron utilizando el test estadístico test t de Student. Un valor p  $\leq$  0.05 se consideró significativo. El número de muestras utilizadas y/o el número de experimentos independientes realizados en cada ensayo se detalla en las leyendas de las figuras correspondientes.

# Ética en el uso de animales en el laboratorio

Todos los animales fueron mantenidos en la Facultad de Medicina y los experimentos se realizaron según lo que dicta la ley uruguaya (Nº 18.611) y los protocolos para el uso de animales en el laboratorio aprobados por el comité de ética de la Facultad de Medicina (Exp. Nº 070153-000119-15, Exp. Nº 070153-000179-13 y Exp. Nº 071140-000880-12). La manipulación de los animales fue realizada por investigadores avalados de categorías A o B según la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

# Resultados

# Generación de parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB y estimación de la concentración de Fe-SODs

Para poder estudiar el rol de la Fe-SODB *in vitro* e *in vivo* durante la infección al huésped se generó una línea de parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB utilizando el plásmido pRIBOTEX<sup>(297)</sup> y la cepa Dm28c.



Figura 38. Generación de parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB y estimación del contenido de Fe-SODA y B en T. cruzi. A. Western blot de Fe-SODs recombinantes a diferentes concentraciones (carriles 1-6: 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1.0 μg) y extractos totales (50 μg) de T. cruzi (carril 7: epimastigota WT, carril 8: epimastigota sobrexpresante, carril 9: tripomastigota WT, carril 10: tripomastigota sobrexpresante). Las imágenes se adquirieron con el sistema Odyssey (LI-COR), se analizaron utilizando el software Image Studio y los resultados se graficaron como la fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIR) en función de la cantidad de proteína. Dm28c and CL-Brener se utilizaron como cepas WT para el análisis de Fe-SODB y Fe-SODA respectivamente. Resultados representativos de cuatro determinaciones. B. Inmunocitoquímica de los parásitos Dm28c (WT) y sobrexpresantes de la Fe-SODB en las formas epimastigota y tripomastigota utilizando el anticuerpo de conejo anti-Fe-SODB, el secundario anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488 (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia (1000x, escala 5 µm). C. Extractos solubles de T. cruzi (4 x 10<sup>8</sup> epimastigotas) fueron analizaron por electroforesis (10 %) y posteriormente se realizó el ensayo de actividad SOD con NBT como se describe en materiales y métodos. Las zonas con actividad SOD se visualizan como zonas acromáticas. En paralelo se realizó un gel en las mismas condiciones pero teñido con Coomasie blue como control de carga. Resultados representativos de tres experimentos independientes. D. Extractos de T. cruzi (50 µg) se analizaron por Western blot utilizando distintos anticuerpos primarios. Las imágenes se obtuvieron utilizando el sistema Odyssey (LI-COR) y se analizaron con el software Image Studio. WT: cepa Dm28c, Fe-SODB: parásitos sobrexpresantes.

Este plásmido posee la ventaja de que se integra en el ADN genómico y por tanto genera cepas sobrexpresantes estables, que no requieren del continuo agregado de antibiótico para mantener la sobrexpresión. La transfección y posterior selección de parásitos resistentes a la G418 resultó en un aumento entre tres y diez veces del contenido proteico de Fe-SODB y en la actividad SOD total (~1 a 6 U/mg), tanto en la forma epimastigota como tripomastigota (figura 38 A-B-C). Otras enzimas del sistema antioxidante de T. cruzi (Fe-SODA, TcCPx, TcMPx, TXN-1, TXN-2 y TryS) no se sobrexpresaron en esta línea (figura 38 D). Posteriormente, utilizando las proteínas recombinantes de las Fe-SODs y anticuerpos específicos para dichas enzimas, se estimó el contenido de la Fe-SODA y Fe-SODB en las cepas CL-Brener y Dm28c respectivamente (tabla 8). Se utilizó también la cepa CL-Brener ya que los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODA (ya disponibles en el laboratorio, cedidos amablemente por el Dr. Shane Wilkinson) poseen el fondo genético de dicha cepa. Los valores obtenidos se encuentran en el rango de 10-40 µM para los parásitos WT, los cuales son similares al previamente reportado para la Mn-SOD de células endoteliales (12 ± 3) μM <sup>(72)</sup>. Para determinar la concentración molar se estimó el volumen del epimastigota y tripomastigota como se detalla en "Materiales y métodos". Estos valores concuerdan con otros reportados previamente<sup>(86)</sup>, siendo de (28.1  $\pm$  1.5) fL y (10.7  $\pm$  0.7) fL para la forma epimastigota y tripomastigota respectivamente. Es interesante notar que el contenido de

Concentración de Fe-SOD en T. cruzi (µM)

		Epimastigota	Tripomastigota
Fe-SODB	Dm28c	9 ± 4	28 ± 11
	Dm28c-FeSODB	133 ± 27	426 ± 30
Fe-SODA	CL-Brener	12 ± 3	36 ± 8
	Brener-FeSODA	56 ± 18	125 ± 7

Fe-SODs aumenta en la forma infectiva con respecto a la no infectiva, de acuerdo con lo previamente reportado mediante análisis proteómicos<sup>(309)</sup>.

**Tabla 8.** Concentraciones estimadas interpolando la señal de fluorescencia en el infrarrojo cercano de los extractos proteicos de *T. cruzi* (1.5 x 10<sup>7</sup> parásitos) en los gráficos mostrados en la figura 37. Las masas de Fe-SOD por parásito se convirtieron a concentraciones utilizando las masas moleculares de las proteínas (obtenidas con la herramienta ExPASy ProtParam) y los volúmenes de las formas epimastigota y tripomastigota. Los resultados están expresados como la media ± SEM de cuatro determinaciones.

# La sobrexpresión de la Fe-SODB disminuye la generación de peroxinitrito dentro del parásito

La habilidad de la Fe-SODB de detoxificar el  $O_2^{\bullet-}$  dentro del parásito y, en consecuencia, evitar la formación de peroxinitrito fue evaluada en un experimento de competencia utilizando epimastigotas pre-cargados con la sonda boronato de fluoresceína (FL-B) y el compuesto SIN-1. El SIN-1 se descompone a pH fisiológico generando flujos similares de  $O_2^{\bullet-}$  y •NO y por tanto, funciona como dador de peroxinitrito<sup>(301, 310)</sup>. El peroxinitrito reacciona con la FL-B y genera un producto fluorescente ( $k = 1.7 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a 37°C y pH 7.4), por lo que se espera que en presencia de SOD la fluorescencia sea menor. La oxidación intracelular de la FL-B se evaluó mediante citometría de flujo a diferentes tiempos (10-30 min) en ausencia (control) o presencia de SIN-1 (0.1 mM; flujo de peroxinitrito de ~1.7  $\mu$ M/min a 28°C). Los resultados de este experimento muestran que la sobrexpresión de la Fe-SODB limita la oxidación de la FL-B, indicando que esta enzima previene la generación de peroxinitrito debido a la detoxificación de uno de sus reactivos, como se observó previamente para la isoforma mitocondrial, Fe-SODA<sup>(311)</sup> (figura 39).



Figura 39. La sobrexpresión de la Fe-SODB disminuye la formación de peroxinitrito SIN-1-dependiente dentro del parásito. Epimastigotas WT o sobrexpresantes de la Fe-SODB se pre-cargaron con FL-B (1 x 10<sup>8</sup>) y se incubaron en ausencia (control) o presencia de SIN-1 (0.1 mM) a 28°C. A distintos tiempos (10-30 min) se tomó una alícuota y se analizó mediante citometría de flujo.

Posteriormente, evaluamos la capacidad de los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB de disminuir la generación de peroxinitrito durante la fagocitosis en macrófagos. Para ello, los macrófagos fueron primero estimulados para inducir la iNOS y producir <sup>•</sup>NO (IFN-γ/LPS, 5 h) y luego fueron infectados durante 2 h con tripomastigotas WT o sobrexpresantes de la Fe-SODB previamente cargados con FL-B. Es importante recordar que la propia infección estimula la activación de la NOX-2 y la generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> hacia el parásito internalizado<sup>(22, 146, 302, 303)</sup>. La oxidación de la FL-B fue observada solamente en los parásitos que se encontraban dentro de los fagosomas, demostrando que se produce peroxinitrito como ya se había reportado previamente<sup>(55)</sup> (figura 40 A-B).



Figura 40. La sobrexpresión de Fe-SODB disminuye la formación de peroxinitrito dentro del parásito durante la fagocitosis en macrófagos. Macrófagos J774A.1 se estimularon durante 5 h para inducir la iNOS (IFN-γ, 800 U/mL; LPS, 16 µg/mL). Los macrófagos se infectaron con tripomastigotas pre-cargados con FL-B (relación parásito:célula de 5:1) durante 2 h a 37°C. A-B. La oxidación de la FL-B se evaluó mediante microscopía de fluorescencia con 400x de aumento. A. Superposición de la señal de la fluoresceína y campo claro. Escala 50 µm. B. A la izquierda señal de la fluoresceína y a la derecha la superposición con el campo claro. Inset: parte de la imagen magnificada. Escalas 200 µm y escalas de los inset 50 µm. C. La intensidad de píxel promedio por amastigota se obtuvo de las micrografías utilizando el software ImageJ. Se muestra la media ± SEM de 70 amastigotas, \*: p < 0.0001, test t de Student. D-E. Alternativamente, las células se recolectaron mecánicamente luego de la infección y se analizaron mediante citometría de flujo. Control y Ctl corresponden a macrófagos no estimulados y IFN-y/LPS corresponde a macrófagos estimulados. En algún caso, L-NAME (10 mM) se adicionó al medio previo a la infección para inhibir la producción de •NO y de peroxinitrito. Se muestra la media ± SEM de duplicados, \*: p < 0.05, test t de Student. F. Macrófagos J774A.1 se infectaron con tripomastigotas (relación parásito:célula de 5:1) durante 2 h a 37°C. Posteriormente las células se lavaron, fijaron y trataron con DAPI (5 µg/mL). Los preparados se analizaron en un microscopio de fluorescencia con aumento 1000x. El porcentaje de invasión se calculó como el número de amastigotas/100 macrófagos y se expresaron relativas al WT (Dm28c). Se muestra la media ± SEM de cuatro determinaciones, \*: p < 0.05, test t de Student .

De acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento con SIN-1, la oxidación de la FL-B resultó ser significativamente menor en los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB (figura 40 B-C). El contenido de fluoresceína (producto de oxidación de la FL-B con peroxinitrito) se evaluó mediante citometría de flujo en presencia o ausencia del inhibidor de la iNOS L-NAME (10 mM). Para los parásitos WT, la oxidación de la FL-B aumentó varias veces en los macrófagos inmunoestimulados en comparación con los no estimulados y esta oxidación disminuyó casi completamente en presencia del inhibidor, lo cual demuestra la presencia de peroxinitrito. Asimismo, cuando se utilizaron los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB la oxidación de la FL-B resultó ser significativamente menor (figura 40 D-E). Este resultado no se debió a diferencias en el porcentaje de invasión y, en consecuencia, menor cantidad de fagosomas, ya que el número de amastigotas intracelulares luego de 2 h de invasión es el mismo para ambas cepas (figura 40 F). Estos resultados muestran que el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> derivado de la NOX-2 del macrófago es capaz de difundir a través de la membrana del

parásito y, en presencia de •NO, de generar peroxinitrito a nivel intracelular. Además, muestran que la Fe-SODB previene la formación de peroxinitrito dentro del parásito durante la fagocitosis en macrófagos.

## Toxicidad del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> derivado del macrófago hacia *T. cruzi*

Evaluar la toxicidad del  $O_2^{\bullet-}$  derivado del macrófago hacia un patógeno es una tarea difícil debido a la falta de inhibidores específicos de la NOX-2 y a la dismutación espontánea del  $O_2^{\bullet-}$  para formar  $H_2O_2$ . En este trabajo utilizamos macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones WT y deficientes en la NOX-2 (gp91- *phox*<sup>-/-</sup>) de forma de poder evaluar el rol del  $O_2^{\bullet-}$  en el control parasitario. A su vez, realizamos las infecciones con cepas WT de *T. cruzi* y cepas sobrexpresantes de las Fe-SODs con el fin de determinar el rol de dichas enzimas durante la fagocitosis en macrófagos.

Los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB citosólica resultaron ser más infectivos que el WT (luego de 24 h) en infecciones a macrófagos no estimulados, demostrando la citotoxicidad del  $O_2^{\bullet-}$  derivado del huésped hacia *T. cruzi* y la importancia de la Fe-SODB citosólica en su eliminación (figura 41).



Figura 41. Los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB son más infectivos que el WT en infecciones a macrófagos. A. Macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones WT o deficientes en la NOX-2 (gp91-*phox<sup>-/-</sup>*) fueron infectados con tripomastigotas de la cepa WT (blanco) o sobrexpresantes de la Fe-SODB (gris), en una relación parásito:célula de 5:1 en DMEM, 10 % SBF y a 37°C. Luego de 24 h los macrófagos se fijaron y se tiñeron con DAPI (5 µg/mL). Los preparados se

visualizaron en microscopio de fluorescencia con aumento 1000x. El porcentaje de infección se calculó como la cantidad de amastigotas intracelulares / 100 macrófagos y se graficaron relativo a la cepa WT. Se muestra la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes, \*: p < 0.05, test t de Student. **B.** Macrófagos J774A.1 se incubaron en ausencia o presencia de IFN- $\gamma$  (800 U/ml) y LPS (16 µg/ml) durante 5 h. Luego se infectaron y analizaron como en el panel A. Se muestra la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes, \*: p < 0.05, test t de Student. **B.** Macrófagos J774A.1 se incubaron en ausencia o presencia de IFN- $\gamma$  (800 U/ml) y LPS (16 µg/ml) durante 5 h. Luego se infectaron y analizaron como en el panel A. Se muestra la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes, \*: p < 0.05, test t de Student.

Como control se utilizaron macrófagos gp91-*phox*<sup>-/-</sup>, con los cuales ambas cepas de parásitos mostraron el mismo grado de infectividad **(figura 41 A)**. Asimismo, los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB citosólica fueron más infectivos que el WT en infecciones a macrófagos estimulados para la producción de •NO (IFN-γ/LPS, 5 h) **(figura 41 B)**. El aumento en la supervivencia de los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB citosólica respecto al WT durante la infección a macrófagos indica que el O<sub>2</sub>•- es capaz de difundir en cantidades significativas hacia el interior del patógeno y de causar daños ya sea directamente o vía la generación de peroxinitrito.

De forma contraria, la sobrexpresión de la Fe-SODA mitocondrial no resultó en un mayor grado de infección en macrófagos no estimulados luego de 24 h (figura 42). Esto puede deberse a la mayor lejanía entre la localización subcelular de esta isoforma y la fuente de  $O_2^{\bullet-}$ . Sin embargo, en infecciones a macrófagos estimulados para la producción de  $^{\circ}NO$  (IFN- $\gamma/LPS$ , 5 h), los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODA mitocondrial si resultaron ser más infectivos que el WT, probablemente debido a que el  $^{\circ}NO$  es un inhibidor de la cadena de

transporte de electrones y causa un aumento en la generación de  $O_2^{\bullet-}$  intra-mitocondrial (figura 42).



Figura 42. Los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODA solamente son más infectivos que el WT en infecciones a macrófagos estimulados para la producción de 'NO. Macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) se incubaron en ausencia o presencia de IFN-γ (800 U/ml) y LPS (16 µg/ml) durante 5 h y fueron infectados con tripomastigotas de la cepa WT o sobrexpresantes de la Fe-SODA (relación parásito:célula de 5:1) en DMEM, 10 % SBF y a 37°C. Luego de 24 h los macrófagos se fijaron y se tiñeron con DAPI (5 µg/mL). Los preparados se visualizaron en microscopio de fluorescencia con aumento 1000x. El porcentaje de infección se calculó como la cantidad de amastigotas intracelulares cada 100 macrófagos y se graficaron relativo a la cepa WT. Se muestra la media ± SEM de cuatro experimentos independientes, \*: p < 0.01, test t de Student.

## Difusión del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> exógeno hacia el interior de *T. cruzi*

Para estudiar la difusión del  $O_2^{\bullet-}$  generado exógenamente hacia el interior de *T. cruzi* se realizaron experimentos con el sistema xantina oxidasa/xantina (XO/X) como fuente externa de  $O_2^{\bullet-(312)}$ . El  $O_2^{\bullet-}$  dentro de *T. cruzi* se evaluó utilizando parásitos pre-cargados con la sonda DHE la cual, en presencia de  $O_2^{\bullet-}$ , se transforma en el producto 2-OH-E<sup>+(305, 313, 314)</sup>. Asimismo, el nivel de  $O_2^{\bullet-}$  intracelular se evaluó midiendo la actividad aconitasa. Epimastigotas y/o tripomastigotas se expusieron al sistema XO/X durante 40 min (flujo de  $O_2^{\bullet-}$  de 3 ± 0.2 µM/min) a pH 7.4. En estas condiciones se observó tanto un aumento en la cantidad de 2-OH-E<sup>+</sup> como una disminución en la actividad aconitasa, mostrando que el  $O_2^{\bullet-}$  es capaz de difundir en estas condiciones e inhibir a la enzima. De acuerdo con lo anterior, la sobrexpresión de la Fe-SODB en *T. cruzi* disminuyó la producción de 2-OH-E<sup>+</sup> y la inactivación de la aconitasa **(figura 43)**.



Figura 43. Difusión del O2\*exógeno cruzi. A. hacia T. Registros primarios representativos de la detección de 2-OH-E+ HPLC mediante acoplado un detector de fluorescencia ( $\lambda_{ex}$  = 510 nm,  $\lambda_{em}$ = 567 nm). Los parásitos 10<sup>6</sup>) (5.3 х se incubaron con xantina (200 uM) v catalasa (0.2 mg/mL) ausencia en 0 presencia de XO (50 mU/mL) durante 40 min (flujo de  $O_2^{\bullet}$  de  $3.1 \pm 0.2 \mu M/min)$ previo al análisis. Un estándar que contiene una mezcla 2-0H-F+ el de y producto no

específico etidio (E<sup>+</sup>) también se muestra. **B.** Las áreas de los picos de 2-OH-E<sup>+</sup> obtenidos como se menciona en el panel A fueron transformadas a cantidades utilizando una curva de calibración ( $\epsilon$  = 0.144 área.pmol<sup>-1</sup>). Se muestran las medias

#### Capítulo 2 Resultados

 $\pm$  SEM de cuatriplicados, \*: p < 0.01, test t de Student. **C.** Tripomastigotas de la cepa WT o sobrexpresante de la Fe-SODB (4.4 x 10<sup>7</sup>) se incubaron con el sistema XO/X como se describe en el panel A y los datos se graficaron como en el panel B. Se muestran las medias  $\pm$  SEM de triplicados, \*,#: p < 0.001, test t de Student. **D.** Epimastigotas (3.0 x 10<sup>8</sup>) se incubaron con el sistema XO/X como se describe en el panel A pero durante 30 min. La actividad aconitasa se midió en los sobrenadantes obtenidos de la lisis celular siguiendo el consumo de cis-aconitato (100 µM) a 240 nm y 28°C en buffer Tris/HCl (50 mM, pH 7.4). Se muestra el porcentaje de actividad relativo al WT en ausencia de XO. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, \*: p < 0.05, test t de Student.

# El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> utiliza canales aniónicos presentes en la membrana de *T. cruzi*

La permeabilidad del  $O_2^{\bullet-}$  en liposomas de fosfolípidos es baja (2 x  $10^{-6}$  cm/s)<sup>(82)</sup>. Sin embargo, este valor podría aumentar en presencia de canales aniónicos en la membrana plasmática<sup>(83)</sup>. Para evaluar esta posibilidad incubamos parásitos pre-cargados con la sonda DHE con  $O_2^{\bullet-}$  generado por el sistema XO/X en ausencia o presencia del inhibidor clásico de canales aniónicos NPPB. Tanto en epimastigotas como en tripomastigotas, la presencia de dicho compuesto resultó en una menor detección de 2-OH-E<sup>+</sup>, y por ende de  $O_2^{\bullet-}$ . Estos resultados indican que a pH neutro, el  $O_2^{\bullet-}$  es capaz de utilizar, en parte, canales aniónicos **(figura 44)**.



Figura 44. El O2\*- utiliza canales aniónicos de membrana en T. cruzi. Epimastigotas (5 x 10<sup>7</sup>) o tripomastigotas (1 x 10<sup>6</sup>) se incubaron con xantina (200 µM) y catalasa (0.2 mg/mL) en ausencia o presencia de XO (50 mU/mL) durante 40 min (flujo de  $O_2^{\bullet-}$  de 3.1 ± 0.2 µM/min). En algunos casos, NPPB (50 µM) se adicionó durante 15 min previo a la exposición a la XO. A y C. Registros primarios representativos de detección de 2-OH-E\* mediante HPLC acoplado un detector de а fluorescencia ( $\lambda_{ex}$  = 510 nm,  $\lambda_{em}$  = 567 nm). Un estándar que contiene una mezcla de 2-OH-E<sup>+</sup> y

el producto no específico

etidio (E<sup>+</sup>) también se muestra. **B y D.** Las áreas de los picos de 2-OH-E<sup>+</sup> obtenidos como se menciona en el panel A y C fueron transformadas a cantidades utilizando una curva de calibración ( $\varepsilon$  = 0.144 área/pmol). Se muestran las medias ± SEM de cuatriplicados (epimastigotas) o duplicados (tripomastigotas), \*: p < 0.01, test t de Student.

## La protonación y difusión del O2<sup>•-</sup> es favorecida a pH ácidos

El  $O_2^{\bullet}$  se encuentra mayoritariamente ionizado a pH neutro (pKa = 4.88)<sup>(67)</sup>. Sin embargo, al pH ácido presente en el fagosoma del macrófago, la concentración de la forma protonada  $HO_2^{\bullet}$  aumenta significativamente pudiendo difundir a través de membranas lipídicas con

mayor facilidad<sup>(51, 90, 100)</sup>. Para evaluar la protonación y difusión del par O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/HO<sub>2</sub><sup>•</sup> durante la fagocitosis, primero determinamos el valor de pH del fagosoma a tiempos tempranos (15 min) de internalización de T. cruzi. Es importante recordar que la cinética de acidificación del fagosoma es diferente para distintas células inmunes, siendo bastante rápida (~5 min) en el caso de los macrófagos. Para la determinación del pH fagosomal, utilizamos un anticuerpo de conejo cuyo antígeno es una fracción enriquecida en membrana de T. cruzi que se conjugó al fluoróforo pH-sensible FITC (figura 45). La fluorescencia del FITC disminuye a pHs ácidos permitiendo la estimación del pH intra-fagosomal realizando una curva de calibración<sup>(315)</sup>. Como situación de máxima fluorescencia se utilizó el inhibidor de la H<sup>+</sup>-ATPasa bafilomicina A1 (B-A1). En la figura 45 C, se muestra como la presencia de B-A1 efectivamente bloquea la acidificación del fagosoma. Tripomastigotas previamente opsonizados con el anticuerpo anti-T. cruzi-FITC se utilizaron para infectar macrófagos en ausencia o presencia de B-A1. En ausencia de B-A1, se observó una señal tenue mediante microscopía de fluorescencia indicando la naturaleza ácida del fagosoma, mientras que en presencia de B-A1 la señal resultó mucho más evidente (figura 45 D). En ausencia de T. cruzi y presencia del anticuerpo no se observó fluorescencia en los macrófagos.





200 µm

**Figura 45. Generación y caracterización del anticuerpo anti-***T. cruzi***-FITC. A.** Espectro de absorción del anticuepo anti-*T. cruzi* conjugado a FITC. La relación entre fluoresceína y proteína (F/P) se obtiene midiendo las absorbancias a 495 nm y 280 nm como se describe en materiales y métodos. **B.** La especificidad del anticuerpo (0.5 µg/mL) se evaluó mediante Western blot. Carriles: 1, BSA (10 µg); 2, J774A.1 (50 µg); 3, *T. cruzi* (50 µg). **C.** La inhibición de la acidificación en presencia de B-A1 se evaluó en macrófagos sin tratar (a) o tratados (b) utilizando partículas de *E. coli* conjugadas a la sonda pH-sensible pHRodo (100 µg/mL). Los fagosomas ácidos se visualizan como puntos rojos mediante microscopía de fluorescencia (400x, escala 200 µm). **D.** Macrófagos J774A.1 pre-tratados con (b) o sin (a) B-A1 (0.15 µM) se incubaron con tripomastigotas opsonizados con el anticuerpo anti-*T. cruzi*-FITC durante 10 min (relación parásito:célula de 5:1) a 37°C. Los parásitos no internalizados se lavaron con PBS y las células se incubaron durante 15 min en DMEM a 37°C. Posteriormente el medio fue reemplazado por PBS frío, B-A1 (0.15 µM) y trypan blue (0.4 % m/v) y las células fueron visualizadas en microscopio de fluorescencia (400x, escala 200 µM).

Una vez caracterizado el sistema, se procedió a medir el pH mediante citometría de flujo (figura 46). La curva de calibración se construyó *in situ*, cambiando el medio de los macrófagos por soluciones ricas en K<sup>+</sup> a distintos pHs, junto con ionóforos K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que posibilitaron que el pH del medio y el pH fagosomal se encuentren en equilibrio (figura 46 B). El pH estimado mediante esta técnica resultó ser de 5.3 ± 0.1, lo cual significa que a los 15 min de fagocitosis de *T. cruzi* un ~27 % del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se encuentra en la forma protonada HO<sub>2</sub><sup>•</sup>.



Figura 46. Determinación del pH fagosomal. Macrófagos J774A.1 incubados en ausencia o presencia de B-A1 (0.15  $\mu$ M) se expusieron a tripomastigotas opsonizados con el anticuerpo anti-*T. cruzi*-FITC durante 10 min (relación parásito:célula de 5:1) a 37°C. Los parásitos no internalizados se lavaron con PBS y las células se incubaron durante 15 min en DMEM a 37°C. Posteriormente el medio fue reemplazado por PBS frío, B-A1 (0.15  $\mu$ M) y trypan blue (0.4 % m/v). **A.** Las

células se recolectaron mecánicamente y se analizaron por citometría de flujo. Ctl: control negativo de macrófagos no infectados. *T. cruzi* : macrófagos infectados. *T. cruzi* + B-A1: macrófagos infectados tratados con B-A1. **B.** Curva de calibración obtenida *in situ* utilizando macrófagos infectados en soluciones ricas en K<sup>+</sup> a diferentes pHs y en presencia de los ionóforos de K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> nigericina y valinomicina (10  $\mu$ M). Las células se equilibraron durante 5 min. Se muestra la gráfica de la media de fluorescencia medida por citometría de flujo en función del pH del buffer. El pH fagosomal se obtuvo de interpolar la media de fluorescencia de la muestra en la curva de calibración.

Luego de la determinación del pH fagosomal se procedió a evaluar la difusión del par O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/HO<sub>2</sub>• en macrófagos infectados con tripomastigotas pre-cargados con la sonda DHE. En algunos casos, los macrófagos se pre-trataron con B-A1 o difeniliodonio (DPI) como control negativo. La detección de 2-OH-E<sup>+</sup>, y por ende de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, fue inhibida significativamente por ambos agentes, indicando que a pH ácido la difusión se encuentra favorecida, probablemente debido al mayor contenido de la especie HO<sub>2</sub>• (figura 47). Es importante destacar que la B-A1 no afectó la fagocitosis de *T. cruzi* ni la actividad NOX-2 (figura 48).



Figura 47. Difusión del O<sub>2</sub> • hacia *T. cruzi* durante la fagocitosis. Tripomastigotas pre-cargados con la sonda DHE ( $2.9 \times 10^7$ ,  $100 \mu$ M, 40 min) se utilizaron para infectar macrófagos J774A.1. En algunos casos los macrófagos se pre-trataron con B-A1 ( $0.15 \mu$ M) o DPI ( $100 \mu$ M) durante 30 min. Luego de 2 h de infección, los productos de reacción del DHE (2-OH-E<sup>+</sup> y E<sup>+</sup>) se analizaron por HPLC. **A.** Registros primarios representativos. Control: macrófagos sin pre-tratar. **B.** Las áreas de los picos de 2-OH-E<sup>+</sup> obtenidos por HPLC fueron transformadas a cantidades utilizando una curva de calibración ( $\epsilon = 0.144$  área.pmol<sup>-1</sup>). Se muestran las medias ± SEM de triplicados, \*: p < 0.05, test t de Student.



Figura 48. La actividad NOX-2 y la fagocitosis de T. cruzi no se ven afectadas por la presencia de B-A1. A. Ensayo de NBT. Macrófagos J774A.1 tratados o sin tratar (B-A1 0.15 µM o DPI 100 µM durante 30 min) se infectaron con T. cruzi (relación parásito:célula de 5:1) en dPBS conteniendo NBT (1 mg/mL). Luego de 30 min a 37°C las células se observaron en un microscopio óptico (aumento 400x, escala 400 µM). Los depósitos de formazan indican la activación de la NOX-2 (flechas). B. Macrófagos tratados o sin tratar se infectaron como en el panel A durante 2 h a 37ºC. Las células se lavaron, se fijaron con formaldehído (4 % v/v) y se tiñeron con DAPI (5 µg/mL). El porcentaje de invasión se calculó como la cantidad de amastigotas cada 100 macrófagos mediante microscopía de fluorescencia. Se muestra la media de ± triplicados.

# Estimación de las concentraciones en estado estacionario del $O_2^{\bullet-}$ y $HO_2^{\bullet}$ durante la fagocitosis de *T. cruzi*

Para determinar las concentraciones en estado estacionario del  $O_2^{\bullet-}$  y  $HO_2^{\bullet}$  dentro del fagosoma se construyó un modelo cinético considerando todas las reacciones y constantes de velocidad involucradas en la producción y consumo del  $O_2^{\bullet-}/HO_2^{\bullet}$  (tabla 9).

Reacciones utilizadas en el modelo cinético del fagosoma				
Reacción	Observaciones	Ref.		
1) Consumo neto de O <sub>2</sub>	R <sub>1</sub> = 0.001 M/s	†		
2) $O_2 \to O_2^{-}$	$R_2 = R_1 + (R_3 + R_4 + R_5) / 2$	‡		
3) 2 $O_2^{-}$ + 2 $H^+ \rightarrow O_2$ + $H_2O_2$	k <sub>3</sub> < 0.3-100 M⁻¹s⁻¹	§		
4) $O_2$ + $HO_2$ + $H^+ \rightarrow O_2$ + $H_2O_2$	k₄ = 8.5-10 x 10 <sup>7</sup> M⁻¹s⁻¹	§		
5) 2 HO <sub>2</sub> • $\rightarrow$ O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	k <sub>5</sub> = 7.6-8.6 x 10 <sup>5</sup> M⁻¹s⁻¹	§		
6) $O_2^{-}$ + H <sup>+</sup> $\leftrightarrow$ HO <sub>2</sub> .	pKa = 4.69-4.88	§		

**Tabla 9.** <sup>†</sup> Calculado como se detalla en materiales y métodos. <sup>‡</sup> La velocidad de producción de  $O_2^{\bullet}$  por la NOX-2 es la suma del consumo neto de  $O_2$  y la mitad de la velocidad de dismutación espontánea. § Behar D, et al. (1970); Bielski BHJ (1978); Bielski BHJ & Allen AO (1977).

Para ello, primero calculamos la velocidad de producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por la NOX-2 por fagosoma luego de la internalización de *T. cruzi* (10-20 min). En este sentido, medimos la velocidad

de consumo neto de  $O_2$  en el analizador de  $O_2$  en placa Seahorse (Agilent) en macrófagos derivados de médula ósea infectados de ratones WT y gp91-*phox*<sup>-/-</sup> (figura 49). La diferencia entre ambas velocidades se debe a la activación de la NOX-2 (figura 49 A). El número de células por condición se contó en cámara de Neubauer luego del análisis y el número de fagosomas por macrófago se evaluó mediante microscopía de fluorescencia, contando la cantidad de parásitos intracelulares teñidos con DAPI (figura 49 B).



**Figura 49. Consumo neto de**  $O_2$  **por fagosoma. A.** Macrófagos derivados de médula ósea de ratones WT o gp91-*phox*<sup>-/-</sup> se incubaron en ausencia o presencia de *T. cruzi* opsonizado con el anticuerpo anti-*T. cruzi*-FITC (parásito:célula de 40:1). La velocidad de consumo de  $O_2$  (Q $O_2$ ) se evaluó en medio de respiración celular (DMEM; glutamina, 2 mM; piruvato, 1 mM; glucosa, 10 mM) a 37°C en el equipo Seahorse (Agilent) antes y después de la inyección de *T. cruzi* (flecha). Se muestran los registros primarios (izquierda) y los valores de Q $O_2$  (derecha), al alcanzar la máxima actividad de la NOX-2 (10-20 min luego de la inyección). Se muestran las medias de las Q $O_2$  ± SEM de quintuplicados. **B.** El número de fagosomas por célula se evaluó contando el número de fagosomas por macrófago mediante microscopía de fluorescencia utilizando DAPI y el anticuerpo anti-*T. cruzi*-FITC (aumento 400x, escala 100 µm).

Teniendo en cuenta el volumen del fagosoma, se estimó el consumo de O<sub>2</sub> por fagosoma. La principal reacción de consumo de O<sub>2</sub>•-/HO<sub>2</sub>• en el fagosoma corresponde a la dismutación espontánea, la cual es pH-dependiente. En nuestro caso, utilizamos para los cálculos el valor de pH determinado anteriormente, 5.3. En suma, bajo las condiciones definidas en la **tabla 10** y las reacciones presentadas en la **tabla 9** se estimó una concentración en estado estacionario en el fagosoma de ~8 x 10<sup>-6</sup> M para el O<sub>2</sub>•- y ~2.5 x 10<sup>-6</sup> M para el HO<sub>2</sub>• a pH 5.3 al inicio de la fagocitosis (~15 min). Estas concentraciones son alcanzadas principalmente debido a la ausencia de SOD, al volumen pequeño del fagosoma y a la alta velocidad de producción de O<sub>2</sub>•- por la NOX-2, de ~2 mM/s. Considerando las concentraciones de estado estacionario estimadas en el lumen del fagosoma y las correspondientes constantes de difusión, estimamos un flujo hacia *T. cruzi* de ~2.3 x 10<sup>-21</sup> y ~3.0 x 10<sup>-19</sup> mol/s para el O<sub>2</sub>•- y el HO<sub>2</sub>• respectivamente. Asumiendo un volumen de 1.0 x 10<sup>-14</sup> L para el parásito internalizado, estos valores corresponden a ~2.3 x 10<sup>-7</sup> y ~3.0 x 10<sup>-5</sup> M/s, para el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y el HO<sub>2</sub>• respectivamente. Es importante recordar que estos valores fueron determinados utilizando la constante de permeabilidad reportada del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para vesículas de fosfolípidos<sup>(82)</sup>, pero podría ser mayor para la membrana de *T. cruzi*, por lo que estos valores podrían estar subestimados. Una observación interesante de los resultados obtenidos es que, a pesar de poseer una concentración de estado estacionario en el fagosoma menor, el flujo del HO<sub>2</sub>• hacia *T. cruzi* es mayor que el del O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> debido a su mayor permeabilidad de membrana.

#### Condiciones utilizadas en los modelos cinéticos

Volumen del fagosoma	1.0 x 10 <sup>-14</sup> L	*
Volumen de <i>T. cruzi</i>	1.0 x 10 <sup>-14</sup> L	†
Área superficial de <i>T. cruzi</i>	1.6 x 10 <sup>-7</sup> cm <sup>2</sup>	‡
Consumo de oxígeno por fagosoma	1.0 x 10 <sup>-17</sup> mol/s (0.001 M/s)	§
pH fagosomal	5.3	¶
Permeabilidad de membrana del O₂⁺	2.1x10 <sup>-6</sup> cm/s	#
Permeabilidad de membrana del HO <sub>2</sub> .	9x10⁻⁴ cm/s	
Constante de difusión del O₂ <sup>⊷</sup>	0.03 s <sup>-1</sup>	**
Constante de difusión del HO <sub>2</sub> ·	11.9 s⁻¹	**
Concentración de estado estacionario del O2 <sup>-</sup> (fagosoma)	8.3 µM	††
Concentración de estado estacionario del HO <sub>2</sub> • (fagosoma)	2.5 μM	††
Velocidad de difusión del O2	0.2 µM/s (2.3 x 10 <sup>-21</sup> mol/s)	<b>‡</b> ‡
Velocidad de difusión del HO <sub>2</sub> ·	30 µM/s (3.0 x 10⁻¹º mol/s)	<b>‡</b> ‡
Concentración de Fe-SODB	28 µM	§§
Constante de reacción entre Fe-SODB y O2-	7.6x10 <sup>8</sup> M⁻¹s⁻¹	¶¶

**Tabla 10.** \* Al inicio de la fagocitosis, el volumen del fagosoma se estima como el volumen del parásito. † Calculado como se describe en materiales y métodos. ‡ Calculada a partir de micrografías electrónicas (Nogueira N & Cohn Z, 1976; Alvarez MN et al., 2011; Ley V et al., 1990; Andrews NW et al., 1990; Kress Y et al., 1977) utilizando el software ImageJ como se describe en materiales y métodos. § Calculado como se describe en materiales y métodos. ¶ Medido como se describe en materiales y métodos. # Ref. Takahashi MA & Asada K (1983). || Ref. Korshunov SS & Imlay JA (2002). \*\* Calculada como  $k_d = \frac{P \times A}{V_f} \times 10^{-3}$ . †† Calculada como se describe en materiales y métodos. ‡‡ Calculada como  $J_{in} = k_d \times C_{ss} \times V_f$  and  $\frac{dC_{tc}}{dt} = \frac{J_{in}}{V_{tr}}$ . §§ Medida como se describe en materiales y métodos. ¶ Martínez A et al. (2014).

Posteriormente, se construyó un segundo modelo cinético para estimar la concentración de estado estacionario del  $O_2^{\bullet^-}$  en el citosol de *T. cruzi*. Al pH intracelular  $(7.1)^{(85)}$  prácticamente todo el  $O_2^{\bullet^-}$  se encuentra ionizado (99.6 %)<sup>(67)</sup>. Por lo tanto, teniendo en cuenta esta consideración y que la velocidad de formación se corresponde con la velocidad de difusión y la velocidad de consumo con la suma de las velocidades de dismutación espontánea y catalizada por la Fe-SODB, se estimó una concentración en estado estacionario de ~1.4 x 10<sup>-9</sup> M para la cepa WT y un orden de magnitud menor para los parásitos sobrexpresantes de Fe-SODB. Este valor podría ser algo menor si tomamos en cuenta la reacción del  $O_2^{\bullet^-}$  con otros blancos celulares como ser la aconitasa (k ~10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup><sup>(57, 58)</sup>). Sin embargo, conociendo la alta concentración de Fe-SODB presente en el citosol y su mayor constante de reacción **(tabla 10)**, la diferencia entre el estado estacionario presentado en este trabajo y el calculado teniendo en cuenta a otros blancos es prácticamente nula. Un resultado interesante de esta simulación es que en ausencia de Fe-SODB, la concentración en estado estacionario de  $O_2^{\bullet^-}$  en *T. cruzi* aumentaría a ~1.2 x 10<sup>-5</sup>

M, mostrando la importancia de esta enzima en la detoxificación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> derivado del macrófago.

# La sobrexpresión de la Fe-SODB aumenta la virulencia en un modelo agudo murino de la enfermedad de Chagas

Para obtener una confimación del aumento de la virulencia en los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB *in vivo*, se realizaron infecciones en ratones C57BL/6. Dado que el grado de infectividad es muy variable dependiendo de la cepa del ratón, la cepa del parásito y las condiciones en las que éstos se mantuvieron en el laboratorio; primero pusimos a punto la cantidad de tripomastigotas a utilizar con la cepa WT (figura 50 A-B). Posteriormente, se realizaron infecciones con ambas cepas de parásitos y se evaluó la parasitemia y la carga parasitaria tisular en tejido de corazón. Los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB produjeron valores de parasitemias mayores que el WT (figura 50 C) y entre 3-4 veces mayor carga parasitaria en corazón (figura 50 D). Estos resultados, junto a los obtenidos *in vitro* en este trabajo, muestran que la Fe-SODB cumple un rol importante para la virulencia en etapas tempranas de infección.



Figura 50. La sobrexpresión de la Fe-SODB aumenta la virulencia en el modelo agudo murino de la enfermedad de Chagas. Ratones hembras (10-12 semanas de edad) se inocularon intraperitonealmente con tripomastigotas (5 x 10<sup>6</sup> - 2 x 10<sup>7</sup>) y la infección aguda fue evaluada. A. La parasitemia se midió recolectando 3 µL de sangre de la vena de la cola y la cantidad de parásitos en 32 campos se contó utilizando una cámara de Neubauer. Se muestra la media ± SEM de 5 ratones. B. Imagen de un campo en donde se observa un tripomastigota entre los glóbulos rojos del ratón (aumento 400x, escala 50 μm). **C.** Tripomastigotas WT o sobrexpresantes de la Fe-SODB (2 x 10<sup>7</sup>) se utilizaron para ratones. infectar los l a parasitemia se midió como en el

panel A. Se muestra la media  $\pm$  SEM de 5 ratones, \*: p < 0.05, test t de Student. **D.** Luego de 10 días de infección, el corazón (~100 mg) de los ratones infectados se homogeneizaron en DNAzol y el ADN se purificó siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de ADN de *T. cruzi* se cuantificó mediante qPCR utilizando la sonda SYBR Green. La cantidad de ADN del ratón se cuantificó en paralelo utilizando primers específicos para el gen de la GAPDH. El aumento en la cantidad de ADN de *T. cruzi* en los corazones de los ratones infectados con la cepa sobrexpresante con respecto al WT se calculó como 2<sup>-ΔΔCt</sup>, donde ΔCt representa la diferencia entre el valor Ct de *T. cruzi* y GAPDH y ΔΔCt representa la diferencia entre el ΔCt de los parásitos sobrexpresantes y los parásitos WT. Se muestra la media  $\pm$  SEM de 6 ratones por grupo, \*: p < 0.01, test t de Student.

# Discusión y conclusiones

El radical  $O_2^{\bullet-}$  es una especie transitoria debido en parte a su dismutación espontánea ( $k = 4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pH 7.4)<sup>(101)</sup> y a la eficiente detoxificación por parte de la SOD ( $k \sim 10^8 \cdot 10^9$ )<sup>(97, 98)</sup>. Su naturaleza aniónica y su baja permeabilidad de membrana ( $2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{(82)}$ ) confina a esta especie principalmente a su sitio de formación y en bajas concentraciones de estado estacionario ( $\sim 10^{-10}$  to  $10^{-11}$  M en la matriz mitocondrial)<sup>(70, 72)</sup>. Sin embargo, en el pequeño volumen del fagosoma del macrófago y en ausencia de SOD, la concentración de  $O_2^{\bullet-}$  generada por la NOX-2 es mucho mayor pudiendo generar daños al patógeno internalizado. En neutrófilos, incluso con la presencia de 1 mM MPO (la cual consume  $O_2^{\bullet-}$ ) la concentración de esta especie en estado estacionario se estabiliza en 25  $\mu$ M<sup>(73)</sup>.Debido a esto, varias cepas patógenas de microorganismos poseen una isoforma de la SOD periplasmática y/o SOD secretada que les defiende del  $O_2^{\bullet-}$  generado durante la fagocitosis<sup>(90-93)</sup>. En *T. cruzi* la presencia de una SOD extracelular es incierta y por lo tanto la cantidad de esta enzima en el fagosoma no se espera que sea significativa.

Para estudiar la toxicidad del O<sub>2</sub><sup>••</sup> hacia *T. cruzi* durante la fagocitosis se generaron parásitos sobrexpresantes de la isoforma citosólica Fe-SODB (figura 38). La concentración de Fe-SODB en parásitos WT resultó ser similar a la previamente reportada para la Mn-SOD en células endoteliales<sup>(72)</sup> aumentando entre 3-10 veces en la cepa sobrexpresante (figura 38 y tabla 8). Durante la infección en macrófagos, y en presencia del dador de  $O_2^{\bullet}/^{\bullet}NO$  SIN-1, esta cepa disminuyó significativamente la formación de peroxinitrito dentro del parásito (figura 39 y 40). Los efectos dañinos del peroxinitrito sobre diferentes biomoéculas son bien conocidos<sup>(177)</sup>, siendo una molécula altamente citotóxica para *T. cruzi* (LD<sub>50</sub> < 0.3 fmol/*T. cruzi*)<sup>(145)</sup>. Es interesante notar que este resultado no solo indica que el peroxinitrito se produce en parte dentro del parásito durante la fagocitosis sino también que la Fe-SODB contribuye a evitar su formación. De acuerdo con estas observaciones, los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB resultaron ser más infectivos en macrófagos tanto estimulados como no estimulados para la producción de •NO (figura 41). Esta diferencia no se observó cuando se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea de ratones gp91phox<sup>-/-</sup>, confirmando la dependencia del O2<sup>•-</sup> en los resultados obtenidos anteriormente (figura 41). De forma contraria a los observado para los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB, la sobrexpresión de la Fe-SODA mitocondrial no resultó en un mayor grado de infección en macrófagos no estimulados luego de 24 h (figura 42), probablemente debido a que el O<sub>2</sub><sup>••</sup> derivado del macrófago no es capaz de difundir hasta la mitocondria de T. cruzi. Sin embargo, estudios previos han demostrado que esta enzima cumple un rol importante en la detoxificación del O2<sup>•-</sup> mitocondrial, previniendo la muerte del parásito por apoptosis en presencia, por ejemplo, de inhibidores mitocondriales, como ser el 'NO o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>(60, 227)</sup>. De acuerdo con estas observaciones previas, los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODA mitocondrial si resultaron ser más infectivos que el WT en infecciones a macrófagos estimulados para la producción de 'NO (IFN-γ/LPS, 5 h) (figura 42).

Para que la Fe-SODB tuviese un efecto sobre el  $O_2^{\bullet^-}$  generado durante la fagocitosis, el  $O_2^{\bullet^-}$  debía ser capaz de difundir a través de la membrana del parásito. Utilizando la sonda DHE, y evaluando la producción del producto específico de reacción con  $O_2^{\bullet^-}$  2-OH-E<sup>+</sup>, se pudo corroborar que el  $O_2^{\bullet^-}$  atraviesa la membrana de *T. cruzi* tanto en la forma epimastigota como tripomastigota y que la sobrexpresión de la Fe-SODB disminuye su concentración (figura 43). La aconitasa es uno de los blancos clásicos del  $O_2^{\bullet^-}$ , el cual inactiva a la enzima.

Al exponer los parásitos de la cepa WT a una fuente exógena de O2<sup>•-</sup> se observó la inactivación de la aconitasa confirmando los resultados obtenidos anteriormente con el DHE. Asimismo, al utilizar la cepa sobrexpresante de la Fe-SODB se observó que la actividad de la enzima era mayor que el WT, aún en ausencia de fuente de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> exógena (figura 43), lo cual indica que esta enzima podría cumplir un rol también en la protección contra el O2<sup>•-</sup> generado de forma endógena. Por otro lado, se logró determinar que el O<sub>2</sub>• es capaz de difundir a través de la membrana utilizando canales aniónicos sensibles al inhibidor NPPB (figura 44). Estudios del genoma de *T. cruzi* y algunos ensayos experimentales, sugieren la presencia de dichos canales en la membrana plasmática, aunque no han sido caracterizados aún<sup>(84-86)</sup>. Asimismo, se pudo corroborar que la difusión del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se encuentra favorecida a pHs ácidos (figura 47) debido probablemente a la protonación y formación del radical HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, el cual posee una permeabilidad de membrana mayor que el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (9 x 10<sup>-4</sup> y 2 x 10<sup>-6</sup> cm/s<sup>(82, 90)</sup> respectivamente). En los macrófagos la cinética de acidificación del fagosoma es rápida<sup>(55, 101)</sup>, sin embargo el valor de pH durante la fagocitosis de *T. cruzi* era desconocido. Para lograr determinar la proporción de HO<sub>2</sub>• en el fagosoma determinamos el pH del fagosoma durante eventos tempranos de fagocitosis (15 min) de T. cruzi en macrófagos siendo de ~5.3 lo cual indica que en estas condiciones un ~27% del  $O_2^{\bullet}$  se encuentra como HO<sub>2</sub>• (figura 46). Dada la mayor permeabilidad de membrana de este radical respecto al O2<sup>•-</sup> y las altas concentraciones que se esperan en el fagosoma, la difusión hacia el patógeno internalizado se torna significativa. De hecho, estudios con cepas de E. coli deficientes en las SODs periplasmática y citosólica presentan un 30 % de inactivación de la enzima fumarasa cuando las bacterias son expuestas a flujos externos de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a pH 6.5 pero no se observa casi inhibición a pH 8.4, cuando la cantidad de HO<sub>2</sub><sup>•</sup> es despreciable<sup>(90)</sup>. En nuestro caso, la inhibición de la H<sup>+</sup>-ATPasa, y por tanto de la acidificación del fagosoma, disminuye la detección de 2-OH-E<sup>+</sup> detectado dentro de los parásitos, mostrando la importancia en la protonación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para la difusión (figura 47). Luego de obtener estos resultados, se construyó un modelo cinético que permitiese estimar las concentraciones de estado estacionario del par O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/HO<sub>2</sub><sup>•</sup> en el fagosoma y en el citosol de T. cruzi (tablas 9 y 10). Para lograr este objetivo se determinó el valor de consumo de O<sub>2</sub> neto por fagosoma para determinar la actividad de la NOX-2 y por tanto, la velocidad de producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> al inicio de la fagocitosis (figura 49). La concentración en estado estacionario del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en el fagosoma resultó ser de ~8 μM, valor algo menor pero en el orden al ya reportado para neutrófilos<sup>(73)</sup>. Una observación interesante es que, aunque la concentración del HO2<sup>•</sup> estimado resultó menor (~2.5µM) que la del O2<sup>•-</sup>, la velocidad de difusión hacia T. cruzi de este radical es mucho mayor, principalmente debido a su permeabilidad de membrana (similar a la del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2-16 x 10<sup>-4</sup> cm/s)<sup>(73, 102, 103)</sup>. Sin embargo, la permeabilidad del O2<sup>•-</sup> varía en función de la composición de la membrana, aumentando en presencia de canales aniónicos<sup>(83)</sup>. En este trabajo utilizamos la constante de permeabilidad para el O2<sup>•-</sup> obtenida con vesículas de fosfolípidos por lo que la velocidad de difusión estimada para este radical puede estar subvalorada. Posteriormente determinamos la concentración de O2<sup>•-</sup> en estado estacionario en el citosol de T. cruzi siendo, al inicio de la fagocitosis, de ~1.4 x 10<sup>-9</sup> M o de ~9.4 x 10<sup>-11</sup> M para la cepa WT o sobrexpresante de la Fe-SODB respectivamente. El primer valor es un órden de magnitud mayor que el reportado para la matriz mitocondrial o el reportado en E. coli en condiciones normales (rango ~10<sup>-10</sup> a 10<sup>-11</sup> M)<sup>(70-72)</sup>. Estas estimaciones muestran la importancia de la presencia de una enzima robusta, resistente a oxidantes que sea capaz de detoxificar este radical durante el ataque oxidativo del macrófago<sup>(98)</sup>. De hecho, los cálculos en ausencia de Fe-SODB muestran que la concentración de  $O_2^{\bullet-}$  en el citosol sería de ~1.2 x 10<sup>-5</sup> M. Por

#### 90 Capítulo 2 Discusión y conclusiones

último, evaluamos el rol de la Fe-SODB en la virulencia *in vivo* realizando infecciones en ratones (figura 50). Los parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB produjeron mayores paraistemias y una mayor carga parasitaria tisular en tejido de corazón en la fase aguda de la infección, en concordancia con los resultados obtenidos *in vitro*. En conjunto, los resultados de este capítulo confirman que la Fe-SODB contribuye a la virulencia de *T. cruzi* durante la fase aguda de la infección participando en la detoxificación del  $O_2^{\bullet}$  y previniendo la formación de oxidantes derivados del huésped.

# **CAPÍTULO 3**

Rol de aminoácidos cercanos al hemo en el mecanismo catalítico de la *Tc*APx-CcP y contribución a la virulencia *in vitro* e *in vivo* 

# Resumen

Durante la fagocitosis de *T. cruzi* en macrófagos el parásito se expone a  $O_2^{\bullet-}$  ya sea generado por la NOX-2 o debido a la inhibición mitocondrial •NO-dependiente. El  $O_2^{\bullet-}$  dismuta de forma espontánea o catalizada a  $H_2O_2$ . Para protegerse de los efectos nocivos del  $H_2O_2$  el parásito expresa varias enzimas que catalizan su descomposición, entre ellas la *Tc*APx-CcP. Esta enzima es una hemo-peroxidasa híbrida la cual puede utilizar ascorbato o, como se mostró recientemente, cyt c<sup>2+</sup> como agente reductor. A pesar de que se logró medir la eficiencia catalítica con este último agente, el mecanismo de reacción aún no está dilucidado y será objeto de estudio de este capítulo. Asimismo, la demostración reciente de que esta enzima se encuentra en la membrana plasmática de las formas infectivas amastigota y trypomastigota sugiere que la *Tc*APx-CcP puede tener un rol en la invasión a células de mamífero y el establecimiento de la infección. En este capítulo exploramos esta hipótesis realizando infecciones *in vitro* a macrófagos y cardiomiocitos e *in vivo* utilizando un modelo murino de la fase aguda de la enfermedad.

## Resultados más importantes

- Los espectros de absorción de la *Tc*APx-CcP recombinante muestran la formación de un compuesto tipo I característico de la generación de un radical triptofanilo (Trp<sup>•+</sup>).
- Utilizando la enzima nativa (WT) y la que posee la mutación W233F se identificó la presencia del Trp233<sup>•+</sup> y de otro radical centrado en la Cys222, sugiriendo un mecanismo de IET entre el Trp y la Cys.
- Parásitos sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP resultaron ser más infectivos en macrófagos y cardiomiocitos así como en un modelo de la etapa aguda de la Enfermedad de Chagas en ratones.
- Estos resultados confirman la participación del Trp233 y Cys222 en el mecanismo catalítico de detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de cyt c<sup>2+</sup> y sugieren que la enzima contribuye en la virulencia del parásito.

# Materiales y métodos

# Expresión y purificación de la *Tc*APx-CcP WT y W233F

La expresión y purificación de la enzima WT y W233F se realizó como se reportó previamente<sup>(208)</sup>. Brevemente, bacterias *E. coli* DE3 transfectadas con el plásmido se cultivaron en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) a 37°C hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0.6. En ese momento se bajó la temperatura a 22°C y se adicionó IPTG (0.8 mM) y ácido γ-amino-levulínico (0.5 mM) durante toda la noche. La purificación se realizó utilizando columnas de afinidad de níquel (HiTrap 5 mL de Amersham Biosciences) equilibradas con el buffer de unión (buffer fosfato 50 mM, pH 7.4, imidazol 10 mM y NaCl 500 mM). La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de imidazol (10-500 mM) en HPLC a un flujo de 3 mL.min<sup>-1</sup>. El imidazol se removió de las fracciones eluídas mediante gel filtración en HPLC utilizando las columnas HiTrap desalting de Amersham Biosciences y buffer fosfato (50 mM, pH 7.4). La pureza se evaluó mediante electroforesis con SDS al 15 % y la absorbancia (a 409 nm o 414 nm para la enzima WT o W233F respectivamente) se utilizó para cuantificar el contenido de holoenzima en la muestra ( $\epsilon$ = 101 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)<sup>(216)</sup>. El contenido proteico total se midió utilizando el método de Bradford.

## Análisis espectroscópico

Los espectros (region UV-visible) de la *Tc*APx-CcP WT y W233F (2  $\mu$ M) se obtuvieron a 25°C en ausencia o presencia de cantidades equimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer PBS.

# Análisis en espectrofotómetro de flujo detenido

La *Tc*APx-CcP WT y W233F (2  $\mu$ M final) se mezclaron con cantidades equimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM) a 10°C y se midió el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro de flujo detenido (Applied Photophysics SX-20) cuyo tiempo de mezclado es < 2 ms. La formación del compuesto I se evaluó midiendo la absorbancia a 409 nm o 414 nm para la enzima WT o W233F respectivamente.

## Alquilación de tioles

La alquilación de tioles en la enzima WT y W233F se realizó incubando la enzima (60  $\mu$ M) con NEM (10 mM) durante 2 h en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) a 4°C. El exceso de NEM se removió inmediatamente mediante gel filtración utilizando las columnas HiTrap desalting de Amersham Biosciences y PBS como buffer de elución. La alquilación se confirmó mediante el ensayo de DTNB<sup>(257)</sup>.

## EPR e inmuno-spin trapping

Los espectros de EPR de la *Tc*APx-CcP WT, W233F y las enzimas tratadas con NEM se registraron a temperatura ambiente ( $25^{\circ}$ C) en el equipo MiniScope MS400 de Magnetech Instruments. La mezcla de reacción contenía la enzima (60  $\mu$ M), 3,5-dibromo-4-nitrosobencenosulfonato (DBNBS, 10 mM) o DMPO (100 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60  $\mu$ M) y DTPA (0.1

mM) en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4). Inmediatamente luego de la adición del  $H_2O_2$ , las muestras se transfirieron a una celda plana de 100 μL y se registraron los espectros en un tiempo total de 1 min (una adquisición). Las condiciones instrumentales fueron: microwave pover, 20 mW; modulation amplitude, 2.5 G; time constant, 0.2 s; scan rate, 1.67 G/s. En los experimentos de inmuno-spin trapping, las enzimas WT, W233F y tratadas con NEM (10  $\mu$ M) se expusieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-30  $\mu$ M) en presencia de DMPO (100 mM). Luego del tratamiento, las proteínas se analizaron mediante electroforesis en gel al 15 % con SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon en PBS y leche descremada (5 % m/v) durante 1 h. Los aductos DMPO-proteína se detectaron utilizando el anticuerpo policional de gallina anti-DMPO-nitrona (cedido amablemente por el Dr. Ronald Mason) y el anticuerpo policional de conejo anti-*Tc*APx-CcP. La incubación de ambos anticuerpos con las membranas se realizó 1/2000 en PBS con Tween-20 (0.1 % v/v) y BSA (5 % m/v) durante 1 h a 25°C como se describió previamente<sup>(145)</sup>. Las membranas se lavaron con PBS y Tween-20 (0.1 % v/v) y se incubaron durante 1 h a 25°C con el anticuerpo anti-IgG de gallina (IR Dye-800; Licor Bioscience) y el anticuerpo anti-IgG de conejo (IR Dye-680; Licor Bioscience) en PBS, Tween-20 (0.1 % v/v) y en una dilución 1/15000. Las proteínas reactivas se visualizaron utilizando el sistema de detección de fluorescencia en el infrarojo Odyssey de Licor Bioscience.

### Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa se evaluó utilizando ascorbato o cyt c<sup>2+</sup> como sustrato reductor como se describió para *L. major*<sup>(205, 316)</sup>. El cyt c se redujo previamente con ditionito y el exceso de reductor se removió inmediatamente mediante gel filtración utilizando las columnas HiTrap desalting de Amersham Biosciences y buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) como buffer de elución. La concentración de cyt c<sup>2+</sup> se calculó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 550 nm ( $\varepsilon_{550nm}$  = 8900 y 29900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para la forma reducida y oxidada del cyt c respectivamente). Los ensayos se realizaron en espectrofotómetro (Cary) a temperatura ambiente y buffer fosfato (100 mM, pH 7.4). La actividad peroxidasa ascorbato-dependiente se monitoreó a 290 nm ( $\varepsilon_{290nm}$  = 2800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) incubando la enzima (0-1 µM) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 µM) y ascorbato (200 µM). La actividad peroxidasa dependiente de cyt c<sup>2+</sup> se evaluó a 550 nm incubando la *Tc*APx-CcP WT (0.05-0.3 µM) o W233F (0.1-1 µM) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-40 µM) y cyt c<sup>2+</sup> (50 µM).

## Análisis por espectrometría de masa

La enzima *Tc*APx-CcP W233F (16  $\mu$ M) se trató con cantidades equimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer fosfato (100 mM, pH 7.4) a 25°C en presencia de DMPO (100 mM). El DMPO en exceso se removió inmediatamente mediante gel filtración utilizando la columna HiTrap desalting de Amersham Biosciences y buffer bicarbonato de amonio (50 mM, pH 8) como buffer de elución. La muestra se hidrolizó utilizando la enzima tripsina (relación tripsina:proteína de 20:1, grado de secuenciación, Promega) durante toda la noche a 37°C. Los péptidos obtenidos se analizaron utilizando un espectrómetro de masa con triple cuadrupolo y trampa de iones lineal (QTRAP 4500; ABSciex) acoplado a un HPLC (Infinity 1260; Agilent). Los péptidos se separaron utilizando la columna de fase reversa (Vydac 218TP; C18, 150 x 2.1 mm, 5  $\mu$ m) y se eluyeron utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo (0.1 % v/v ácido fórmico) de 0-45 % en 90 min y a un flujo de 0.25 mL.min<sup>-1</sup>. El voltaje del ionizador de tipo *electrospray* fue de 5.5 kV y la temperatura del capilar de 500°C. Los péptidos se detectaron en modo positivo utilizando un rango de masas de 300 a 2000 Da. A los iones de interés se le realizó MS/MS. Los resultados se adquirieron utilizando el software Analyst 1.6.2 (ABSciex) y se analizaron utilizando el kit BioTool designado para PeakView 2.1 (ABSciex).

## Parásitos

Los epimastigotas de *T. cruzi* (CL-Brener, WT) se cultivaron a 28°C en medio BHI suplementado con SBF (10 % v/v) como se describió previamente<sup>(294)</sup>. Los epimastigotas sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP se obtuvieron como en trabajos previos<sup>(145, 189, 204)</sup> transformando epimastigotas CL-Brener con el plásmido pTEX-APX-9E10 (cedido amablemente por el Dr. Shane Wilkinson). Estos parásitos se cultivaron de la misma manera que la cepa WT pero suplementando el medio con el antibiótico de selección G418 (250 µg/mL, Sigma).

## Infecciones en células

Epimastigotas se diferenciaron a la forma infectiva tripomastigota metacíclico<sup>(189)</sup>, los cuales se utilizaron para infectar cultivos confluentes de células Vero (cedidas por la Dra. Dolores Piñeyro) a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Cuatro días post-infección se comenzaron a recolectar del sobrenadante de los cultivos tripomastigotas, los cuales se utilizaron para infectar macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67) y cardiomiocitos H9c2 (ATCC CRL-1446) en medio DMEM suplementado con SBF (10 % v/v), penicilina (100 mg/mL) y estreptomicina (100 mg/mL). La infección se realizó en una relación parásito:célula de 5:1<sup>(22)</sup> en placas Lab-Tek de vidrio durante 2 h a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Posteriormente, los parásitos no internalizados se removieron mediante tres lavados sucesivos con PBS y las células se incubaron a 37°C y 5 %  $CO_2$  durante 24 o 96 h en DMEM con SBF (10 % v/v). Luego de este período las células se fijaron con PFA (4 % v/v en PBS) durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 (0.1 % v/v en PBS) conteniendo el fluoróforo DAPI (5 µg/mL) durante 10 min a temperatura ambiente. El número de parásitos cada 100 macrófagos o cardiomiocitos se determinó contando la cantidad de amastigotas intracelulares y la cantidad de células utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE-200) con un amento de 1000x. Al menos 1000 células de tres experimentos independientes se contabilizaron. Los resultados se expresan como la cantidad de amastigotas cada 100 células.

## Infecciones en animales

Ratones BALB/c machos o C57BL/6 hembras de 7-10 semanas de edad se inocularon intraperitonealmente (5 ratones por grupo) con tripomastigotas derivados de cultivos (1.5 x 10<sup>7</sup>) de la cepa CL-Brener (WT) o sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP. La parasitemia se evaluó a partir de sangre de la vena de la cola (3  $\mu$ L) contando la cantidad total de tripomastigotas sanguíneos en 32 campos en una cámara de Neubauer a un aumento de 400x. El protocolo utilizado fue aprobado previamente por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Medicina, UDELAR (expediente no. 070153-000119-5) y las

97

personas que manipularon los animales se encontraban acreditadas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal.

### Análisis de datos

Los datos presentados en este capítulo, a no ser que se especifique lo contrario, corresponden a las medias de replicados independientes  $\pm$  SEM. Las medias se compararon utilizando el test *t* de Student en donde un *p* < 0.05 se consideró significativo.

# Resultados

# Espectros de absorción de la *Tc*APx-CcP en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y formación del compuesto tipo I

La enzima nativa (WT) y la enzima mutada en el Trp233 (W233F) se expresaron y purificaron a partir de cultivos de *E. coli* (>99 % de pureza) siguiendo el protocolo de purificación reportado previamente<sup>(208)</sup> (**figura 51**).



**Figura 51. Purificación de la** *Tc***APx-CcP WT y W233F.** Las fracciones de elución obtenidas durante la purificación mediante columna de afinidad de níquel utilizando un gradiente lineal de imidazol de la enzima WT (carriles 1-8) o W233F (carriles 9-12) se analizaron por electroforesis con SDS en gel al 15 % y tinción de Coomassie blue.

Dado que recientemente se mostró que la *Tc*APx-CcP pertenece a la clase de hemoperoxidasas híbridas<sup>(208)</sup>, que utilizan tanto ascorbato como cit  $c^{2+}$  como agente reductor, se procedió a dilucidar el mecanismo de reacción entre esta enzima y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Leishmania major* posee una APx-CcP<sup>(216)</sup> cuyo mecanismo de reacción con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involucra a un Trp2O8 cercano al hemo, el cual rápidamente reduce al radical centrado en la porfirina del compuesto I dando lugar a un radical catiónico en dicho aminoácido y formando lo que se denomina un compuesto tipo I (del inglés: I-like) **(figura 19)**. Para investigar si la *Tc*APx-CcP forma este compuesto se realizaron espectros de absorción (de 350 a 650 nm) antes y después de la adición de cantidades equimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **(figura 52 A).** 



Figura 52. Análisis espectroscópico de la *TcAPx-CcP* WT y W233F. Espectros de absorción de la *TcAPx-CcP* WT (2  $\mu$ M) (A) y la W233F (B). Las flechas indican el máximo de absorbancia antes (línea sólida) o después (línea punteada) del agregado de cantidades equimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El corrimiento en el pico de Soret es indicativo de la formación del compuesto tipo I. C. La enzima W233F se incubó con (línea punteada) o sin (línea sólida) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10°C y el cambio de absorbancia en el pico de Soret (414 nm) se midió en espectrofotómetro de flujo detenido. La disminución en el pico de Soret es indicativo del aformación del compuesto I.

600

600

La enzima posee un máximo de absorbancia a 409 nm que se corre a 420 nm frente al agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con la aparición adicional de dos picos pequeños a 539 y 560 nm. Estos cambios espectrales son indicativos de la generación de un compuesto tipo I<sup>(205, 316, 317)</sup> (figura 52 A). Al analizar la enzima W233F, el pico de Soret apareció con un máximo a 414 nm, indicando que el reemplazo del aminoácido perturba estructuralmente el microambiente del hemo (figura 52 B). Al agregar  $H_2O_2$  a la W233F el corrimiento se produjo a 418 nm y solamente uno de los dos picos nuevos se observó (560 nm) (figura 52 B). Posteriormente, dado que la formación del compuesto tipo I es muy rápida, se realizaron experimentos en un espectrofotómetro de flujo detenido a 10°C para intentar detectar la formación del compuesto I clásico. En las hemoperoxidasas, la formación del compuesto I conduce a una disminución en el pico de Soret<sup>(205, 317, 318)</sup> lo cual se puede observar por ejemplo en la peroxidasa de rábano (HRP) y en la APx-W208F de L. major, cuya mutación aumenta la vida media del compuesto I<sup>(205)</sup>. En el caso de la TcAPx-CcP-W233F se registró una disminución muy rápida de la absorbancia a 414 nm (5 ms), que luego desapareció, sugiriendo que la formación del compuesto I ocurre pero que rápidamente se transforma en un compuesto tipo I alternativo (figura 52 C). Este resultado nos condujo a plantearnos la hipótesis de que otros aminoácidos, adicionamente al Trp233, podrían reducir al compuesto I.

## Detección del radical Trp233<sup>•+</sup> y rol de la Cys222

Se realizaron experimentos de EPR para determinar los aminoácidos involucrados en el ciclo catalítico de la *Tc*APx-CcP luego del agregado de  $H_2O_2$ . Se registraron espectros de las enzimas (60  $\mu$ M) en presencia de cantidades equimolares de  $H_2O_2$  y el *spin trap* DBNBS (10 mM). La señal generada por la adición de dicho compuesto a la proteína se pierde en presencia de la mutación W233F **(figura 53)** demostrando la participación de este aminoácido en la generación del compuesto tipo I del ciclo catalítico.



Figura 53. Registros de EPR. La *Tc*APx-CcP WT o W233F (60  $\mu$ M) se incubó con DBNBS (10 mM) en ausencia (A) o presencia (B) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60  $\mu$ M) y la muestra se analizó por EPR.

Posteriormente, se analizó si otros aminoácidos podrían también participar generando un compuesto tipo I alternativo. Un análisis estructural del ambiente cercano al hemo en peroxidasas híbridas de tipo A reveló la presencia de un residuo de cisteína (Cys222 para la *Tc*APx-CcP) cercana al Trp233<sup>(205, 316)</sup>, la cual no se encuentra en la familia de APx<sup>(217)</sup>. Es más, la mutación en la Cys197 en la enzima análoga de *L. major* disminuye más de 100 veces la actividad peroxidasa dependiente de cyt c<sup>2+</sup> sin afectar su actividad ascorbato-dependiente<sup>(205, 316)</sup>. Debido a este precedente, y a los resultados espectroscópicos mostrados en el apartado anterior, decidimos explorar el rol de la Cys222 en la actividad peroxidasa dependiente de cyt c<sup>2+</sup> alquilando los tioles de la enzima con NEM. De las 6 Cys presentes en la *Tc*APx-CcP, solamente 4 se encuentran accesibles al solvente. Como se muestra en la **figura 54**, la enzima WT tratada con NEM reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generando un

compuesto tipo I (figura 54 A), sin embargo, la actividad peroxidasa dependiente de cyt  $c^{2+}$  de la enzima tratada disminuyó un 70 %, mientras que la actividad peroxidasa ascorbatodependiente no se vio afectada (figura 54 D). De manera interesante, cuando la enzima W233F tratada con NEM se expuso a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se observaron cambios en el pico de Soret (figura 54 C) y la actividad peroxidasa ascorbato-dependiente también se vio afectada



(figura 54 D). Estos resultados indican que alguna cisteína accesible al solvente (probablemente la Cys222 cercana al hemo y al Trp233) es necesaria para la formación del compuesto tipo I.

Figura 54. Actividad peroxidasa de la *Tc*APx-CcP pre-tratada con NEM. A. Espectros de absorción de la *Tc*APx-CcP pre-tratada con NEM (2  $\mu$ M) antes (línea sólida) y después (línea punteada) del agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2  $\mu$ M). B. Actividad dependiente de cyt c<sup>2+</sup> de la *Tc*APx-CcP tratada (línea punteada) o no tratada (línea sólida) con NEM. La actividad se midió siguiendo el cambio de

absorbancia a 550 nm de la enzima (0.01  $\mu$ M) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20  $\mu$ M) y cyt c<sup>2+</sup> (20  $\mu$ M). La flecha indica el agregado de la enzima. **C.** Espectros de absorción de la *Tc*APx-CcP tratada con NEM (2  $\mu$ M) antes (línea sólida) y después (línea punteada) del agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2  $\mu$ M). **D.** Actividad peroxidasa dependiente de ascorbato de la *Tc*APx-CcP WT (0.13  $\mu$ M) y W233F (1  $\mu$ M) tratadas (+) o no tratadas (-) con NEM. El ensayo se realizó en presencia de ascorbato (200  $\mu$ M) y se graficaron las pendientes (UA.seg<sup>-1</sup>) del cambio de absorbancia a 290 nm. Se muestra la media ± SEM de n = 5. \*\*\* denota diferencias significativas con un *p* < 0.0001 según el test t de Student.

Posteriormente, se procedió a detectar mediante Western blot la presencia de un radical tiílo en las enzimas (10  $\mu$ M) expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-30  $\mu$ M). Para ello se utilizó el spin trap DMPO (100 mM) y los aductos DMPO-nitrona se evaluaron utilizando el anticuerpo anti-DMPO<sup>(319)</sup>. En la enzima WT, se observó la presencia de aductos de manera creciente con la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada (figura 55 A). Esta señal se inhibió completamente al pre-tratar la enzima con NEM, sugiriendo fuertemente la participación de cisteínas en dichos aductos (figura 55 A). Además, esta señal aumentó significativamente en la enzima W233F, sugiriendo que en la ausencia del Trp233, la Cys222 podría participar en la reducción del compuesto I, conduciendo a la formación de un compuesto tipo I alternativo. Estos resultados se corroboraron mediante experimentos de EPR (figura 55 B). La reacción de la enzima WT (60  $\mu$ M) con cantidades equimolares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de DMPO (100 mM) condujo a la aparición de una señal paramagnética, la cual aumentó significativamente en la enzima W233F (figura 55 B). Por otro lado, la señal observada se inhibió casi completamente al tratar previamente las enzimas con NEM (figura 55 B), sugiriendo fuertemente que el aducto DMPO-proteína se encuentra en alguna cisteína importante para la actividad peroxidasa (figura 54 B y D). Por último, para confirmar la posición de la cisteína involucrada en el ciclo catalítico, se realizó un mapeo peptídico por espectrometría de masa de la TcAPx-CcP W233F expuesta a H2O2. En estas condiciones se detectó, entre otros, al péptido L<sup>203</sup>-K<sup>237</sup> con el DMPO unido a la Cys222 (tiempo de elución

en el HPLC = 60.2 min y m/z para el ion tetra cargado [M+DMPO+4H]<sup>4+</sup> = 971.4) **(figura 55 C)**. En resumen, los resultados de EPR, Western blot y MS confirman la formación de un radical en la Cys222 lo cual conduce a la generación de un compuesto tipo I alternativo en el ciclo catalítico de la *Tc*APx-CcP.



Figura 55. Inmuno-spin trapping, EPR y MS. A. La TcAPx-CcP WT y W233F (10 μM), tratadas (+) o no tratadas (-) con NEM, se expusieron a  $H_2O_2$  (0-30  $\mu$ M) en presencia de DMPO (100 mM). Las muestras se analizaron mediante Wester blot utilizando los anticuerpos anti-DMPO (verde) y anti-TcAPx-CcP (rojo) como control de carga. En la segunda línea se observa la superposición de ambos canales. B. Espectros de EPR de la TcAPx-CcP WT (izquierda) y W233F (derecha) (60 µM) en presencia de DMPO (100 mM) antes (línea A) y después (línea B) del agregado de  $H_2O_2$  (60  $\mu$ M). La línea C es igual a la línea B excepto que las enzimas fueron pre-tratadas con NEM. C. Análisis por espectrometría de masa del aducto TcAPx-CcP-DMPO. La TcAPx-CcP W233F (16 µM) se expuso a  $H_2O_2$  (16  $\mu$ M) en presencia de DMPO (100 mM), se hidrolizó con tripsina y se analizó por MS. Se muestra el espectro de fragmentación del ion tetra-cargado de m/z 971.1. En la figura se muestra la secuencia del péptido y los fragmentos detectados.

# Aumento de la virulencia en los parásitos sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP

Dado que la *Tc*APx-CcP forma parte del sistema antioxidante del parásito, se investigó si el aumento en el contenido de esta enzima le confería una ventaja para su supervivencia en el macrófago. Para ello, se infectaron macrófagos con parásitos tripomastigotas WT o sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP y se evaluó el grado de infectividad a las 24 h midiendo la cantidad de amastigotas intracelulares. Los parásitos sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP fueron más resistentes a la toxicidad del macrófago comparados a la cepa WT, indicando la participación de esta enzima en la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado durante la fagocitosis **(figura 56 A)**. Posteriormente, se evaluó la infectividad en cardiomicitos. Se utilizaron estas células ya que el tejido cardíaco es uno de los sitios de preferencia de localización del parásito en la etapa crónica de la enfermedad. Resultados previos han mostrado que la infección por *T. cruzi* a cardiomiocitos conduce al establecimiento de una disfunción mitocondrial, con un aumento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y citoquinas pro-inflamatorias (IL-1β y TNF- $\alpha$ )<sup>(320)</sup>. Se evaluó la infectividad de parástios WT y sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP luego de 96 h de infección, tiempo suficiente para que se produzca la disfunción

mitocondrial en los cardiomiocitos y que los amastigotas se repliquen en el citosol. De la misma manera que se observó para los macrófagos, los parásitos sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP resultaron ser más infectivos que los WT (figura 56 A). Estos resultados correlacionan con estudios *in vitro* donde parásitos que no contienen *Tc*APx-CcP presentan niveles menores de infectividad en mioblastos<sup>(219)</sup>. Por último, y para validar el aumento en la virulencia de los parásitos sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP *in vivo*, realizamos infecciones en ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 (figura 56 B). Los resultados obtenidos muestran que los parásitos sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP poseen mayores parasitemias durante la etapa aguda, confirmando que esta enzima le confiere a *T. cruzi* una mayor capacidad de sobrevivir y replicarse durante esta etapa de la enfermedad.



Figura 56. La sobrexpresión de TcAPx-CcP aumenta la virulencia en T. cruzi. A. Tripomastigotas derivados de cultivo se utilizaron para infectar las células en una relación parásito:célula de 5:1. Luego de 24 h (macrófagos) o 96 h (cardiomiocitos) se evaluó la cantidad de amastigotas cada 100 células mediante tinción de núcleos con DAPI utilizando un microscopio de fluorescencia. Se muestra la media ± SEM de n = 3. \*denota diferencias significativas con un p < 0.05 utilizando el test t de Student. B. Tripomastigotas derivados de cultivo (1.5 x 10<sup>7</sup>) se utilizaron para infectar ratones BALB/c o C57BL/6 (n = 5 por grupo). La parasitemia se evaluó a partir de sangre de la vena de la cola extraída a post-infección diferentes días contando la cantidad de parásitos en cámara de Neubauer en microscopio. Se muestra la media  $\pm$  SEM de n = 5. \*denota diferencias significativas con un p < 0.05 utilizando el test t de Student
#### Discusión y conclusiones

Estudios previos mostraron que la TcAPx-CcP es una peroxidasa híbrida de tipo A que puede utilizar tanto ascorbato como cyt c<sup>2+</sup> como agente reductor<sup>(208)</sup>. A diferencia de las hemoperoxidasas clásicas, el análisis espectral de la reacción de la enzima con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostró la formación de un compuesto tipo I (figura 52 A) característico de la generación de un Trp233<sup>•+</sup> en la proteína<sup>(316)</sup>. La participación de este radical en el ciclo catalítico se pudo comprobar mediante experimentos de EPR (figura 53) y mediante la utilización de la enzima W233F. En esta enzima no se detecta la señal de EPR observada en la enzima WT y, a su vez, posee una disminución considerable de su actividad peroxidasa dependiente de cyt  $c^{2+(208)}$  (figura 53). El análisis de la reacción entre la enzima W233F y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en busca de la detección del compuesto I clásico derivó en el descubrimiento de la formación de un compuesto tipo I alternativo (figura 52 B y C). Este resultado indica que, además del Trp233, otro aminoácido cercano al hemo es capaz de reducir al compuesto I. Las hemoperoxidasas híbridas de tipo A contienen un residuo de Cys cercano al hemo (Cys222 y Cys197 para T. cruzi y L. major respectivamente)<sup>(215)</sup>. Experimentos de inmuno-spin trapping, EPR y espectrometría de masa utilizando DMPO revelaron la presencia de un radical tiílo en la Cys222 de la enzima WT expuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual aumenta en la enzima W233F (figura 55). En este sentido, la alquilación de tioles dramáticamente disminuyó la actividad peroxidasa cyt c<sup>2+</sup> dependiente (figura 54 B). Por otro lado, se evaluó el rol de la TcAPx-CcP en la virulencia utilizando cultivos celulares y un modelo de infección aguda de Enfermedad de Chagas en ratones. Se utilizaron dos modelos celulares (macrófagos y cardiomiocitos) relevantes en el ciclo de vida del parásito y en los que se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la infección<sup>(10, 22, 320)</sup>. En ambos modelos, los parásitos sobrexpresantes de la *Tc*APx-CcP resultaron ser más infectivos que la cepa WT, de acuerdo con la hipótesis de que esta peroxidasa juega un rol importante en la protección de T. cruzi de los efectos citotóxicos derivados del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proveniente de la célula huésped (figura 56 A). Análisis proteómicos recientes indican que cepas virulentas de T. cruzi expresan niveles altos de TcAPx-CcP, la cual aumenta en la fase infectiva<sup>(190, 309)</sup>. Sin embargo, aunque los estudios con parásitos que no contienen TcAPx-CcP muestran que estos parásitos son más susceptibles a la muerte por oxidantes in vitro, la actividad de esta enzima en dicho trabajo no resultó determinante para el establecimiento de la infección en un modelo animal de la enfermedad de Chagas<sup>(219)</sup>. Una posible explicación para este resultado podría ser que *T*. cruzi se encuentra muy bien adaptado a infectar y permanecer en el huésped vertebrado y posee actividades enzimáticas redundantes que le permiten sobrevivir al ataque oxidativo. Los parásitos que no contienen TcAPx-CcP, contienen otras peroxidasas, incluyendo a la CPX, que son capaces de detoxificar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (k TcAPx-CcP- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 2.9 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1(208)</sup> y k CPX- $H_2O_2 = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1(321)}$ ). Además, dos supuestas hemo-peroxidasas adicionales se encuentran en el genoma del parásito (TcCLB.507011.130 y TcCLB.511143.30) las cuales aún no se han caracterizado y estudiado. Por lo tanto, realizamos infecciones en ratones (BALB/c y C57BL/6) utilizando parásitos sobrexpresantes de la TcAPx-CcP para determinar su rol *in vivo*. Las parasitemias de estos últimos fueron significativamente más altas que las de la cepa WT (figura 56 B). Este resultado confirma que la TcAPx-CcP contribuye a la virulencia del parásito, al menos en el modelo murino utilizado en este trabajo. En resumen, los datos presentados en este capítulo proveen evidencias mecanísticas del ciclo catalítico de la TcAPx-CcP, el cual involucra a los residuos Trp233 y Cys222 cercanos al hemo (esquema 2) y contribuyen a definir su rol biológico en la Enfermedad de Chagas.



Esquema 2. Rol del Trp233 y Cys222 en el ciclo catalítico. La vía A implica la reducción de la porfirina a expensas de la formación del Trp233-O\* (mayoritaria) mientras que la vía B involucra la reducción dependiente de la Cys222. La transferencia de electrones entre el Trp233 y la Cys222 también se muestra.

## Conclusión general y perspectivas

Durante la fagocitosis de *T. cruzi* en macrófagos se activa la NOX-2 con la consecuente producción de grandes cantidades de  $O_2^{\bullet-}$  hacia el lumen del fagosoma. El  $O_2^{\bullet-}$  a pH ácido parcialmente se protona y forma HO<sub>2</sub><sup>•</sup> (pKa = 4.8). En este trabajo se muestra que ambas especies son capaces de atravesar la membrana del parásito y ejercer efectos tóxicos intracelulares. En condiciones pro-inflamatorias, se induce la producción de •NO por la iNOS. Este radical posee una capacidad de difusión muy alta y, en presencia de  $O_2^{\bullet-}$ , genera peroxinitrito. A su vez, el •NO inhibe el complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo cual genera un aumento en la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en la mitocondria (esquema 3).

En este trabajo se muestra que el peroxinitrito inhibe a las Fe-SODA (mitocondrial) y Fe-SODB (citosólica) del parásito debido a la nitración de la Tyr35. Esta modificación es menor en la Fe-SODB debido a la presencia de una cisteína, Cys83, que está ausente en la isoforma mitocondrial y que reduce, mediante un mecanismo de IET, al Tyr35-O<sup>•</sup> previniendo la nitración e inactivación de la enzima **(esquema 3)**. El Cys83-S<sup>•</sup> generado es finalmente reducido por la T(SH)<sub>2</sub>, principal tiol de bajo peso molecular de *T. cruzi*, permitiendo que la Fe-SODB pueda reaccionar con más de una molécula de ONOO<sup>-</sup> sin ser inactivada *in vivo*. Como perspectiva, sería interesante generar los mutantes en la Fe-SODB en los Trp79 y Trp9 por fenilalanina (aminoácido presente en estas posiciones en la Fe-SODA mitocondrial) para corroborar experimentalmente el mecanismo de IET propuesto en este trabajo. A su vez, resta evaluar si el GSH (presente a una concentración de 0.23 ± 0.06 mM en epimastigotas)<sup>(196)</sup> es capaz de reparar al Cys83-S<sup>•</sup> como lo hace la T(SH)<sub>2</sub>.

La diferencia de susceptibilidades encontradas en las Fe-SODA y Fe-SODB expuestas a ONOO<sup>-</sup> nos condujo a pensar que la Fe-SODB podría tener un rol en la defensa del parásito durante la fagocitosis, momento en el cual el flujo de ONOO<sup>-</sup> hacia el parásito es alto. Utilizando parásitos sobrexpresantes de la Fe-SODB se encontró que esta enzima protege al parásito de los efectos tóxicos directos e indirectos del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, por ejemplo la generación de peroxinitrito **(esquema 3)**. Los parásitos sobrexpresantes resultaron ser más infectivos que el WT en infecciones a macrófagos e *in vivo* en un modelo de la etapa aguda de la enfermedad en ratones. Como perspectiva, resta estudiar el rol de la Fe-SODB durante la fase crónica de la enfermedad. Para ello sería interesante realizar infecciones en cardiomiocitos con la cepa sobrexpresante de la enzima y evaluar la carga parasitaria *in vivo* a los seis meses de infección (fase crónica). Por otro lado, es de interés continuar en el estudio del rol de la Fe-SODA durante la fagocitosis en condiciones de inmunoestimulación.

*T. cruzi* contiene varias enzimas capaces de detoxificar el  $H_2O_2$ . Una de ellas es una hemoperoxidasa híbrida (APx-CcP) la cual utiliza ascorbato o cyt c<sup>2+</sup> como agente reductor y que se encuentra localizada en el retículo endoplasmático, en la membrana externa mitocondrial y en la membrana plasmática de *T. cruzi*. En este trabajo se profundizó en dilucidar el mecanismo catalítico de esta enzima, encontrándose que el Trp233 y la Cys222 participan del mismo. La reacción entre la APx-CcP y el  $H_2O_2$  deriva en la formación de un

compuesto I que rápidamente, y de forma mayoritaria, forma el Trp233-O<sup>•</sup> a expensas de la reducción de la porfirina (compuesto tipo I). De forma minoritaria se detectó la formación del Cys222-S<sup>•</sup> (compuesto tipo I alternativo) **(esquema 3)**. Por otro lado, dado que recientemente se encontró que la enzima posee otros sitios de localización además del retículo endoplasmático, se decidió estudiar su rol en la defensa del parásito durante la infección a células de mamífero (macrófagos y cardiomiocitos) y en infecciones a ratones. Los parásitos sobrexpresantes de la APx-CcP resultaron ser más infectivos que el WT en estas células y presentaron una mayor parasitemia *in vivo*. Como perspectivas, interesa estudiar la reactividad de la APx-CcP con peroxinitrito, obtener la estructura cristalográfica de la proteína y evaluar la actividad enzimática en presencia de cyt c<sup>2+</sup> de *T. cruzi*.



Esquema 3. Vista esquemática de los resultados obtenidos en este trabajo en relación a las Fe-SODs y APx-CcP de *T. cruzi*.

## Agradecimientos

Primero que nada quiero agradecer a mis padres. A mamá por estar siempre, y con estar me refiero a ESTAR, y a papá por las infinitas charlas de "vida" que tanto me sirvieron para llegar a donde estoy, ison los mejores!

También agradezco infinitamente a Fede, mi compañero de vida, con quien he compartido todo el doctorado, que me ha visto contenta con el trabajo y que me ha escuchado mil veces cuando estaba triste, que me ha cocinado y mimado días y días seguidos cuando me quedaba hasta tarde escribiendo la tesis (ahora es un ejemplo) y porque es el mejor compañero que hay, ¿qué te puedo decir Fede más que gracias, gracias y más gracias?

A Nico, mi hermano. Dicen que la media naranja es la pareja, yo creo que mi medio yo también sos vos Nico (o serías un tercio?), gracias por hacerme reír tanto.

A mi abuela Olga, que ya no está pero que fue fundamental en mi vida y no puede faltar acá, te extraño mucho y te agradezco.

A Alicia, Naty y Fede, por todos los años compartidos juntos.

Al resto de mi familia, los de Montevideo y los de Paysandú; los de siempre y los nuevos (Mary, Ana y Pablo): GRACIAS.

A Andre, Mari, Sara, Vale y Tina, más que acompañarme en esta etapa me han acompañado toda mi vida, gracias por ser mis hermanas.

A Daro, Yessy, Franco y Lu (y próximamente Julia), mis otros hermanos de la vida, y a las pollas, porque sin todos ustedes nunca hubiese disfrutado la facultad como lo hice.

A la walkin', por haber arruinado ya unos cuantos de mis cumpleaños jaja, y hacerme reír, bailar y cantar.

Quiero agradecer a todos los miembros del departamento de bioquímica y del CEINBIO que comparten el día a día conmigo en el laboratorio. Han sido muchos años juntos y TODOS han aportado un granito de arena para que esta tesis sea lo que es hoy. Seguro que mi trabajo no sería lo mismo sin ellos.

En particular quiero agradecer a Lu P, por todo lo que me enseñó en el laboratorio. Cuando entré no había ni siquiera terminado la Facultad y no sabía nada de pipetear y hacer experimentos. Ahora miro para atrás y me doy cuenta todo lo que crecí gracias ella, gracias Lu!

Quiero agradecer a Rafa, por todas las discusiones de resultados y porque ha sido fundamental en el pienso y en la escritura de todos los trabajos que han surgido de esta tesis.

Caro, GRACIAS. Contigo pasé los momentos más lindos y más feos de mi vida. Entramos el mismo año al laboratorio y en todos estos años compartimos mucho más que sólo hacer experimentos. Vivimos juntas, nos fuimos de vacaciones juntas, armamos fiestas en casa juntas, limpiamos y cocinamos juntas, etc, etc. Gracias por todo!!!!!!!!

A Lu González, qué placer tener una amiga tan sabia! Tus consejos han sido fundamentales, sos divina y espero que sigamos trabajando juntas.

A Vale, por darme de comer todas las tardes, jeje. No hay mejor compañera de escritorio que vos

Al Demon y Gaby, mis compañeros de bichos, que me ayudaron y han sido parte de muchos de los experimentos.

A Gonza, por todas las discusiones y haberme enseñado a pensar críticamente y no "pisarme el palito" como decía él. Te extrañamos.

A Pao, porque su trabajo es fundamental! Gracias por todas las veces que acurrí a ti desesperada por un medio urgente o un gel.

A todo el grupo de muchos problemas, Ceci, Pao, Caro, Lu, Adrian, Damián, Naty, Bea, Vale y Marcelo, mis amigos con los cuales me divierto todos los días, me escuchan cuando necesito un oído y con los cuales he compartido ya 10 años de vida!

Al grupo del call center y asociados, Nico C, Santi, Jenny, Mauri, Flo e Ines. Gracias por acompañarme, enseñarme y hacerme sentir que el grupo humano que tenemos es hermoso. Gracias Nico por todos los mates de la tarde! Santi, Jenny e Ines por los consejos experimentales (y prestarme soluciones jaja). Mauri por la ayuda cada vez que necesité un consejo de HPLC o masa y Flo por pelearme y dejarte pelear por mí, jeje.

A Vero D, Vero T y Seba, mis compañeros del "Ceinbio", gracias por la música, mates y consejos de viajes!

Quiero agradecer también a Noel, Pepe, Madia y Celi por toda la ayuda que siempre me han dado cuando he necesitado discutir experimentos. Sus opiniones han sido importantísimas!

A Ari e Irene, que llegaron hace poco pero que me encanta como son y todo lo que aportan al laboratorio desde el punto de vista profesional y personal, son unos genios!

Agradezco también a los que ya no están en el laboratorio pero que han sido mis amigos y han aportado mucho en mi trabajo, Martin y Fiorella.

A los más nuevos del laboratorio, porque traen siempre una sonrisa y ganas de trabajar que contagian.

También agradezco a los que han participado y aportado su expertise en las publicaciones que surgieron de este trabajo. A Dolores Piñeyro y Carlos Robello (Malón) del Instituto Pasteur por enseñarme todo lo que se de biología molecular. A Ariel Petruk, Marcelo Martí,

Diego Moreno, Federico Issoglio, Ari Zeida y Darío Estrín de Argentina por haber realizado todo el trabajo computacional. A Edlaine Linares y Ohara Augusto de Brasil por haberme recibido tan bien en Sao Paulo y enseñarme a usar el EPR y el spin trap DBNBS. A Analía Lima, Carlos Batthyany y Rosario Durán del Instituto Pasteur por enseñarme a detectar 3-NT por masa y a hacer geles 2D. A Nicole Larrieux y Alejandro Buschiazzo del Instituto Pasteur por cristalizar la Fe-SODA. A Mariela Santos y Martin Breijo del bioterio de la Facultad de Medicina, por toda la ayuda en el manejo de animales en el laboratorio.

Agradezco a las agencias financiadoras que han permitido que mi trabajo sea posible. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por su beca de maestría y doctorado y por aceptarme en el Sistema Nacional de Investigadores. A la Comisión Académica de Posgrado por su beca de finalización de doctorado. A PEDECIBA por las alícuotas de estudiante. A la Comisión Sectorial de Investigación Científica por financiar el proyecto Ini-2017-133 (a mi persona) y el proyecto de CSIC grupos (a Rafael Radi). Al National Institutes of Health, por el grant otorgado a Rafael Radi, Nº 1R01AI095173. Al Espacio Interdisciplinario, por el apoyo al CEINBIO. A Biriden intrumental científico, al proyecto MEF y la Ley de Fundaciones por el apoyo a Lucía Piacenza.

Agradezco a Ana Denicola, José Souza y Celia Quijano por haber conformado mi Comisión de Admisión y Seguimiento, haber sido tribunal en mi pasaje, haber evaluado mis informes y haberme dado retroalimentación sobre en qué puntos podía mejorar.

Por último (y no menos importante) quiero agradecer a Ana Denicola, Marcelo Comini, Gustavo Salinas, Leonor Thomson y José Souza por haber aceptado ser postulados para integrar el tribunal de mi tesis.

### Bibliografía

1. Barrias ES, de Carvalho TM, & De Souza W (2013) Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Frontiers in immunology* 4:186.

2. Manne-Goehler J, Umeh CA, Montgomery SP, & Wirtz VJ (2016) Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. *PLoS neglected tropical diseases* 10(11):e0005033.

3. Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, & Stramer SL (2008) Chagas disease and the US blood supply. *Current opinion in infectious diseases* 21(5):476-482.

4. Salvatella R (2016) Chagas en Uruguay, 1937-2016: Información básica para su prevención, control y atención. *Archivos de Pediatría del Uruguay* 87:49-52.

5. Andrade LO & Andrews NW (2005) The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature reviews. Microbiology* 3(10):819-823.

6. Nogueira N & Cohn Z (1976) Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *The Journal of experimental medicine* 143(6):1402-1420.

7. de Carvalho TM & de Souza W (1989) Early events related with the behaviour of Trypanosoma cruzi within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell structure and function* 14(4):383-392.

8. de Souza W (1984) Cell biology of Trypanosoma cruzi. International review of cytology 86:197-283.

9. Kierszenbaum F, Knecht E, Budzko DB, & Pizzimenti MC (1974) Phagocytosis: a defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi. *Journal of immunology* 112(5):1839-1844.

10. Alvarez MN, Piacenza L, Irigoin F, Peluffo G, & Radi R (2004) Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to Trypanosoma cruzi. *Archives of biochemistry and biophysics* 432(2):222-232.

11. Williams DM, Sawyer S, & Remington JS (1976) Role of activated macrophages in resistance of mice to infection with Trypanosoma cruzi. *The Journal of infectious diseases* 134(6):610-623.

12. Kress Y, Bloom BR, Wittner M, Rowen A, & Tanowitz H (1975) Resistance of Trypanosoma cruzi to killing by macrophages. *Nature* 257:394.

13. Behbehani MK (1971) Multiplication of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in mouse peritoneal macrophages. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 65(1):15.

14. Dvorak JA & Schmunis GA (1972) Trypanosoma cruzi: interaction with mouse peritoneal macrophages. *Experimental parasitology* 32(2):289-300.

15. Kress Y, Tanowitz H, Bloom B, & Wittner M (1977) Trypanosoma cruzi: infection of normal and activated mouse macrophages. *Experimental parasitology* 41(2):385-396.

16. de Carvalho TU & de Souza W (1987) Cytochemical localization of NADH and NADPH oxidases during interaction of Trypanosoma cruzi with activated macrophages. *Parasitology research* 73(3):213-217.

17. Sanderson CJ & de Souza W (1979) A morphological study of the interaction between Trypanosoma cruzi and rat eosinophils, neutrophils and macrophages in vitro. *Journal of cell science* 37:275-286.

18. Nathan C, Nogueira N, Juangbhanich C, Ellis J, & Cohn Z (1979) Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of Trypanosoma cruzi. *The Journal of experimental medicine* 149(5):1056-1068.

19. Hoff R (1975) Killing in vitro of Trypanosoma cruzi by macrophages from mice immunized with T. cruzi or BCG, and absence of cross-immunity on challege in vivo. *The Journal of experimental medicine* 142(2):299-311.

20. Alcina A & Fresno M (1987) Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of the mouse macrophage cell line J774 against infection by Trypanosoma cruzi. *Parasite immunology* 9(2):175-186.

21. de Souza W, de Carvalho TM, & Barrias ES (2010) Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. *International journal of cell biology* 2010.

22. Alvarez MN, Peluffo G, Piacenza L, & Radi R (2011) Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem* 286(8):6627-6640.

23. Baldridge CW & Gerard RW (1932) THE EXTRA RESPIRATION OF PHAGOCYTOSIS. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 103(1):235-236.

24. Sbarra AJ & Karnovsky ML (1959) The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of biological chemistry* 234(6):1355-1362.

25. Iyer GYN, Islam MF, & Quastel JH (1961) Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature* 192:535.

26. Iyer GY & Questel JH (1963) NADPH and NADH oxidation by guinea pig polymorphonuclear leucocytes. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 41:427-434.

27. Babior BM, Curnutte JT, & McMurrich BJ (1976) The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *The Journal of clinical investigation* 58(4):989-996.

28. Dhiman M & Garg NJ (2014) P47phox-/- mice are compromised in expansion and activation of CD8+ T cells and susceptible to Trypanosoma cruzi infection. *PLoS pathogens* 10(12):e1004516.

29. Santiago HC, *et al.* (2012) NADPH phagocyte oxidase knockout mice control Trypanosoma cruzi proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS neglected tropical diseases* 6(2):e1492.

30. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr., & Nacy CA (1990) Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of immunology* 144(1):278-283.

31. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, & Moncada S (1990) Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of immunology* 144(12):4794-4797.

32. Adams LB, Hibbs JB, Jr., Taintor RR, & Krahenbuhl JL (1990) Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for Toxoplasma gondii. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *Journal of immunology* 144(7):2725-2729.

33. Metz G, Carlier Y, & Vray B (1993) Trypanosoma cruzi upregulates nitric oxide release by IFN-gammapreactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite immunology* 15(12):693-699.

34. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, & Fresno M (1992) Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunology letters* 33(1):35-40.

35. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, & Sher A (1992) The microbicidal activity of interferon-gammatreated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European journal of immunology* 22(10):2501-2506.

36. Michailowsky V, *et al.* (2001) Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection. *The American journal of pathology* 159(5):1723-1733.

37. Holscher C, *et al.* (1998) Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and immunity* 66(3):1208-1215.

38. Torrico F, *et al.* (1991) Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice. *Journal of immunology* 146(10):3626-3632.

39. Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levi R, & Nathan CF (1989) Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *The Journal of experimental medicine* 169(3):1011-1020.

40. Stuehr DJ & Marletta MA (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(22):7738-7742.

41. Stuehr DJ & Marletta MA (1987) Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer research* 47(21):5590-5594.

42. Stuehr DJ & Marletta MA (1987) Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. *The Journal of Immunology* 139(2):518-525.

43. Petray P, Castanos-Velez E, Grinstein S, Orn A, & Rottenberg ME (1995) Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with Trypanosoma cruzi. *Immunology letters* 47(1-2):121-126.

44. Vespa GN, Cunha FQ, & Silva JS (1994) Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and immunity* 62(11):5177-5182.

45. Saeftel M, Fleischer B, & Hoerauf A (2001) Stage-dependent role of nitric oxide in control of Trypanosoma cruzi infection. *Infection and immunity* 69(4):2252-2259.

46. Cummings KL & Tarleton RL (2004) Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of Trypanosoma cruzi infection in mice. *Infection and immunity* 72(7):4081-4089.

47. Botti H, et al. (2010) Distance-dependent diffusion-controlled reaction of \*NO and O2\*- at chemical equilibrium with ONOO. The journal of physical chemistry. B 114(49):16584-16593.

48. Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, & Koppenol WH (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chemical research in toxicology* 10(11):1285-1292.

49. Goldstein S & Czapski G (1995) The reaction of NO. with O2.- and HO2.: a pulse radiolysis study. *Free radical biology & medicine* 19(4):505-510.

50. Huie RE & Padmaja S (1993) The reaction of no with superoxide. *Free radical research communications* 18(4):195-199.

51. Winterbourn CC & Kettle AJ (2013) Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxidants & redox signaling* 18(6):642-660.

52. Fang FC (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews. Microbiology* 2(10):820-832.

53. And rews NW & Whitlow MB (1989) Secretion by Trypanosoma cruzi of a hemolysin active at low pH. *Molecular and biochemical parasitology* 33(3):249-256.

54. Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, & Griffiths G (1990) A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61(7):1277-1287.

55. Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, & Andrews NW (1990) The exit of Trypanosoma cruzi from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *The Journal of experimental medicine* 171(2):401-413.

56. Butler J, Jayson GG, & Swallow AJ (1975) The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. *Biochimica et biophysica acta* 408(3):215-222.

57. Hausladen A & Fridovich I (1994) Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *The Journal of biological chemistry* 269(47):29405-29408.

58. Castro L, Rodriguez M, & Radi R (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 269(47):29409-29415.

59. Andersson U, Leighton B, Young ME, Blomstrand E, & Newsholme EA (1998) Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle in vitro by superoxide anions and/or nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications* 249(2):512-516.

60. Piacenza L, et al. (2007) Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in Trypanosoma cruzi: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *The Biochemical journal* 403(2):323-334.

61. Irigoin F, et al. (2009) Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in Trypanosoma cruzi. *Biochem J* 418(3):595-604.

62. Gardner PR & Fridovich I (1991) Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *The Journal of biological chemistry* 266(29):19328-19333.

63. Sawyer DT & Valentine JS (1981) How super is superoxide? Accounts of Chemical Research 14(12):393-400.

64. Winterbourn CC & Kettle AJ (2003) Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochemical and biophysical research communications* 305(3):729-736.

65. Imlay JA (2003) Pathways of Oxidative Damage. Annual Review of Microbiology 57(1):395-418.

66. Bielski BHJ & Allen AO (1977) Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. *The Journal of Physical Chemistry* 81(11):1048-1050.

67. Behar D, Czapski G, Rabani J, Dorfman LM, & Schwarz HA (1970) Acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. *The Journal of Physical Chemistry* 74(17):3209-3213.

68. Goncalves RL, Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, & Brand MD (2015) Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *The Journal of biological chemistry* 290(1):209-227.

69. Tahara EB, Navarete FD, & Kowaltowski AJ (2009) Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free radical biology & medicine* 46(9):1283-1297.

70. Cadenas E & Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine* 29(3-4):222-230.

71. Imlay JA & Fridovich I (1991) Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* 266(11):6957-6965.

72. Quijano C, Castro L, Peluffo G, Valez V, & Radi R (2007) Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293(6):H3404-3414.

73. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, & Kettle AJ (2006) Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *The Journal of biological chemistry* 281(52):39860-39869.

74. Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552(Pt 2):335-344.

75. Brand MD (2016) Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free radical biology & medicine* 100:14-31.

76. Babior BM, Kipnes RS, & Curnutte JT (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical investigation* 52(3):741-744.

77. Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93(5):1464-1476.

78. Bedard K & Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87(1):245-313.

79. Vignais PV (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59(9):1428-1459.

80. Griendling KK, Sorescu D, & Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research* 86(5):494-501.

81. Cifuentes-Pagano E, et al. (2013) Bridged tetrahydroisoquinolines as selective NADPH oxidase 2 (Nox2) inhibitors. *MedChemComm* 4(7):1085-1092.

82. Takahashi MA & Asada K (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of biochemistry and biophysics* 226(2):558-566.

83. Lynch RE & Fridovich I (1978) Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *The Journal of biological chemistry* 253(13):4697-4699.

84. Grisard EC, *et al.* (2014) Trypanosoma cruzi Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome announcements* 2(1).

85. Van Der Heyden N & Docampo R (2000) Intracellular pH in mammalian stages of Trypanosoma cruzi is K+dependent and regulated by H+-ATPases. *Molecular and biochemical parasitology* 105(2):237-251.

86. Rohloff P, Rodrigues CO, & Docampo R (2003) Regulatory volume decrease in Trypanosoma cruzi involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Molecular and biochemical parasitology* 126(2):219-230.

87. McCord JM & Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244(22):6049-6055.

88. Li Y, et al. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics* 11(4):376-381.

89. Duttaroy A, Paul A, Kundu M, & Belton A (2003) A Sod2 null mutation confers severely reduced adult life span in Drosophila. *Genetics* 165(4):2295-2299.

90. Korshunov SS & Imlay JA (2002) A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Molecular microbiology* 43(1):95-106.

91. Piddington DL, *et al.* (2001) Cu,Zn Superoxide Dismutase of Mycobacterium tuberculosis Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst. *Infection and immunity* 69(8):4980-4987.

92. Fang FC, *et al.* (1999) Virulent Salmonella typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(13):7502-7507.

93. De Groote MA, *et al.* (1997) Periplasmic superoxide dismutase protects Salmonella from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25):13997-14001.

94. Flint DH, Tuminello JF, & Emptage MH (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *The Journal of biological chemistry* 268(30):22369-22376.

95. Gort AS & Imlay JA (1998) Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *Journal of bacteriology* 180(6):1402-1410.

96. Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, & Davies KJ (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *The Journal of biological chemistry* 265(27):16330-16336.

97. Klug D, Rabani J, & Fridovich I (1972) A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *The Journal of biological chemistry* 247(15):4839-4842.

98. Martinez A, *et al.* (2014) Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of Trypanosoma cruzi iron-superoxide dismutases (Fe-SODs) A and B: disparate susceptibilities due to the repair of Tyr35 radical by Cys83 in Fe-SODB through intramolecular electron transfer. *The Journal of biological chemistry* 289(18):12760-12778.

99. Bielski BHJ (1978) Reevaluation of the spectral and kinetic properties of  $HO_2$  and  $O_2^-$  free radicals. *Photochemistry and Photobiology* 28(4-5):645-649.

100. De Grey AD (2002) HO2\*: the forgotten radical. DNA and cell biology 21(4):251-257.

101. Hackam DJ, et al. (1997) Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na+/H+ exchangers, Na+/K+-ATPases, and vacuolar-type H+-atpases. *The Journal of biological chemistry* 272(47):29810-29820.

102. Seaver LC & Imlay JA (2001) Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing Escherichia coli. *Journal of bacteriology* 183(24):7182-7189.

103. Antunes F & Cadenas E (2000) Estimation of H2O2 gradients across biomembranes. *FEBS letters* 475(2):121-126.

104. Fettiplace R (1978) The influence of the lipid on the water permeability of artificial membranes. *Biochimica et biophysica acta* 513(1):1-10.

105. Bielski BH, Arudi RL, & Sutherland MW (1983) A study of the reactivity of HO2/O2- with unsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 258(8):4759-4761.

106. Henzler T & Steudle E (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in Chara corallina: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H(2)O(2) across water channels. *Journal of experimental botany* 51(353):2053-2066.

107. Bienert GP, Schjoerring JK, & Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta* 1758(8):994-1003.

108. Bienert GP, *et al.* (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry* 282(2):1183-1192.

109. Winterbourn CC (2013) The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in enzymology* 528:3-25.

110. Antunes F & Brito PM (2017) Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. *Redox biology* 13:1-7.

111. Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology* 11:613-619.

112. Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, & Nauseef WM (2013) Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of leukocyte biology* 93(2):185-198.

113. Yamazaki I & Piette LH (1990) ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe2+ ions with H2O2-reactive species in oxygen toxicity in biology. *The Journal of biological chemistry* 265(23):13589-13594.

114. Ignarro LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. Annual review of pharmacology and toxicology 30:535-560.

115. Möller MN, Lancaster JR, & Denicola A (2008) Chapter 2 The Interaction of Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Membranes. *Current Topics in Membranes*, ed Matalon S (Academic Press), Vol 61, pp 23-42.

116. Moller MN & Denicola A (2018) Diffusion of nitric oxide and oxygen in lipoproteins and membranes studied by pyrene fluorescence quenching. *Free radical biology & medicine*.

117. Denicola A, Souza JM, Radi R, & Lissi E (1996) Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Archives of biochemistry and biophysics* 328(1):208-212.

118. Palmer RM, Ferrige AG, & Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122):524-526.

119. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, & Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(24):9265-9269.

120. Stuehr DJ & Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *The Journal of experimental medicine* 169(5):1543-1555.

121. Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et biophysica acta* 1411(2-3):217-230.

122. Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, & Gazzinelli RT (1997) Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *The Journal of Immunology* 159(12):6131-6139.

123. Bergeron M & Olivier M (2006) <em>Trypanosoma cruzi</em>-Mediated IFN-γ-Inducible Nitric Oxide Output in Macrophages Is Regulated by <em>iNOS</em> mRNA Stability. *The Journal of Immunology* 177(9):6271-6280.

124. GAËTANE M, YVES C, & BERNARD V (1993) Trypanosoma cruzi upregulates nitric oxide release by IFN-γpreactivated macrophages, limiting cell infection independently of the respiratory burst. *Parasite immunology* 15(12):693-699.

125. Weinberg JB (1998) Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Molecular medicine* 4(9):557-591.

126. Siedlar M, *et al.* (1999) Demonstration of iNOS-mRNA and iNOS in human monocytes stimulated with cancer cells in vitro. *Journal of leukocyte biology* 65(5):597-604.

127. Fang FC & Vazquez-Torres A (2002) Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 282(5):L941-943.

128. Pham TN, *et al.* (2003) Elevated serum nitric oxide levels in patients with inflammatory arthritis associated with co-expression of inducible nitric oxide synthase and protein kinase C-eta in peripheral blood monocyte-derived macrophages. *The Journal of rheumatology* 30(12):2529-2534.

129. Nicholson S, *et al.* (1996) Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 183(5):2293-2302.

130. Weinberg JB, *et al.* (1995) Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86(3):1184-1195.

131. Kharitonov VG, Sundquist AR, & Sharma VS (1994) Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *The Journal of biological chemistry* 269(8):5881-5883.

132. N. MM, Qian L, R. LJ, & Ana D (2007) Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes. *IUBMB Life* 59(4-5):243-248.

133. Furchgott RF & Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-376.

134. Cooper CE (1999) Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1411(2-3):290-309.

135. Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z, & Rachlin EM (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications* 157(1):87-94.

136. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martinez A, & Radi R (2013) Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxidants & redox signaling* 19(7):723-734.

137. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, & Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(4):1620-1624.

138. Radi R, Beckman JS, Bush KM, & Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 266(7):4244-4250.

139. Radi R, Beckman JS, Bush KM, & Freeman BA (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics* 288(2):481-487.

140. Khairutdinov RF, Coddington JW, & Hurst JK (2000) Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. *Biochemistry* 39(46):14238-14249.

141. Marla SS, Lee J, & Groves JT (1997) Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(26):14243-14248.

142. Denicola A, Souza JM, & Radi R (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(7):3566-3571.

143. Rubbo H, Denicola A, & Radi R (1994) Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of Trypanosoma cruzi energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Archives of biochemistry and biophysics* 308(1):96-102.

144. Denicola A, Rubbo H, Rodriguez D, & Radi R (1993) Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. *Archives of biochemistry and biophysics* 304(1):279-286.

145. Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, & Radi R (2009) Fighting the oxidative assault: the Trypanosoma cruzi journey to infection. *Curr Opin Microbiol* 12(4):415-421.

146. Alvarez MN, Trujillo M, & Radi R (2002) Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods in enzymology* 359:353-366.

147. Squadrito GL & Pryor WA (1998) The Nature of Reactive Species in Systems That Produce Peroxynitrite. *Chemical research in toxicology* 11(7):718-719.

148. Ferrer-Sueta G & Radi R (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 4(3):161-177.

149. Arteel GE, Briviba K, & Sies H (1999) Protection against peroxynitrite. *FEBS letters* 445(2-3):226-230.

150. Ferrer-Sueta G, et al. (2018) Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chemical reviews* 118(3):1338-1408.

151. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, & Cayota A (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free radical biology & medicine* 30(5):463-488.

152. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, & Beckman JS (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical research in toxicology* 5(6):834-842.

153. Keith WG & Powell RE (1969) Kinetics of decomposition of peroxynitrous acid. *Journal of the Chemical Society* A: Inorganic, Physical, Theoretical (0):90-90.

154. Pryor WA & Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *The American journal of physiology* 268(5 Pt 1):L699-722.

155. Goldstein S, Lind J, & Merenyi G (2005) Chemistry of peroxynitrites as compared to peroxynitrates. *Chemical reviews* 105(6):2457-2470.

156. Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, & Radi R (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Archives of biochemistry and biophysics* 333(1):49-58.

157. Radi R, Cosgrove TP, Beckman JS, & Freeman BA (1993) Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *The Biochemical journal* 290 (Pt 1):51-57.

158. Sharpe MA & Cooper CE (1998) Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *The Journal of biological chemistry* 273(47):30961-30972.

159. Pearce LL, Pitt BR, & Peterson J (1999) The Peroxynitrite Reductase Activity of Cytochrome cOxidase Involves a Two-electron Redox Reaction at the Hemea 3-CuB Site. *Journal of Biological Chemistry* 274(50):35763-35767.

160. Trujillo M & Radi R (2002) Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols. *Archives of biochemistry and biophysics* 397(1):91-98.

161. Trujillo M, *et al.* (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 467(1):95-106.

162. Dubuisson M, et al. (2004) Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. FEBS letters 571(1-3):161-165.
 163. Piacenza L, et al. (2008) Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage-

and endogenously-derived peroxynitrite. The Biochemical journal 410(2):359-368.

164. Signorelli S, Moller MN, Coitino EL, & Denicola A (2011) Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* 512(2):190-196.

165. Augusto O, et al. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free radical biology & medicine* 32(9):841-859.

166. Ford E, Hughes MN, & Wardman P (2002) Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. *Free radical biology & medicine* 32(12):1314-1323.

167. Bartesaghi S, *et al.* (2010) Lipid peroxyl radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes. *Chemical research in toxicology* 23(4):821-835.

168. Bartesaghi S, *et al.* (2006) Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. *Biochemistry* 45(22):6813-6825.

169. Prutz WA, Monig H, Butler J, & Land EJ (1985) Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Archives of biochemistry and biophysics* 243(1):125-134.

170. Radi R (2013) Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res* 46(2):550-559.

171. Dhiman M, *et al.* (2009) Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 16(5):660-666.

172. Naviliat M, Gualco G, Cayota A, & Radi R (2005) Protein 3-nitrotyrosine formation during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 38(12):1825-1834.

173. Folkes LK, Trujillo M, Bartesaghi S, Radi R, & Wardman P (2011) Kinetics of reduction of tyrosine phenoxyl radicals by glutathione. *Archives of biochemistry and biophysics* 506(2):242-249.

174. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, & Thompson JA (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21):11853-11858.

175. Quijano C, et al. (2001) Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *The Journal of biological chemistry* 276(15):11631-11638.

176. Yamakura F, Taka H, Fujimura T, & Murayama K (1998) Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *The Journal of biological chemistry* 273(23):14085-14089.

177. Szabo C, Ischiropoulos H, & Radi R (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6(8):662-680.

178. Shiloh MU, *et al.* (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10(1):29-38.

179. Brunelli L, Crow JP, & Beckman JS (1995) The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to Escherichia coli. *Archives of biochemistry and biophysics* 316(1):327-334.

180. Jiang X, Leonard B, Benson R, & Baldwin CL (1993) Macrophage control of Brucella abortus: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cellular immunology* 151(2):309-319.

181. Ko J, Gendron-Fitzpatrick A, & Splitter GA (2002) Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *Journal of immunology* 168(5):2433-2440.

182. Hickman-Davis J, Gibbs-Erwin J, Lindsey JR, & Matalon S (1999) Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9):4953-4958.

183. Gookin JL, Allen J, Chiang S, Duckett L, & Armstrong MU (2005) Local peroxynitrite formation contributes to early control of Cryptosporidium parvum infection. *Infection and immunity* 73(7):3929-3936.

184. Giorgio S, *et al.* (1998) In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infection and immunity* 66(2):807-814.

185. Diefenbach A, *et al.* (1998) Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 8(1):77-87.

186. Murray HW & Nathan CF (1999) Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani. *The Journal of experimental medicine* 189(4):741-746.

187. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, & Balish E (1996) Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infection and immunity* 64(8):3127-3133.

188. Osorio L, Rios I, Gutierrez B, & Gonzalez J (2012) Virulence factors of Trypanosoma cruzi: who is who? *Microbes and infection* 14(15):1390-1402.

189. Piacenza L, et al. (2009) Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence. International journal for parasitology 39(13):1455-1464.

190. Zago MP, *et al.* (2016) Tcl Isolates of Trypanosoma cruzi Exploit the Antioxidant Network for Enhanced Intracellular Survival in Macrophages and Virulence in Mice. *Infection and immunity* 84(6):1842-1856.

191. Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, & Cerami A (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227(4693):1485-1487.

192. Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warnon SS, & Fairlamb AH (2002) A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in Trypanosoma cruzi. *The Journal of biological chemistry* 277(39):35853-35861.

193. Moutiez M, Meziane-Cherif D, Aumercier M, Sergheraert C, & Tartar A (1994) Compared Reactivities of Trypanothione and Glutathione in Conjugation Reactions. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 42(12):2641-2644.

194. Ariyanayagam MR & Fairlamb AH (2001) Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology* 115(2):189-198.

195. Ariyanayagam MR, Oza SL, Mehlert A, & Fairlamb AH (2003) Bis(glutathionyl)spermine and Other Novel Trypanothione Analogues in Trypanosoma cruzi. *Journal of Biological Chemistry* 278(30):27612-27619.

196. Thomson L, Denicola A, & Radi R (2003) The trypanothione-thiol system in Trypanosoma cruzi as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Archives of biochemistry and biophysics* 412(1):55-64.

197. Irigoin F, *et al.* (2008) Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free radical biology & medicine* 45(6):733-742.

198. Hugo M, Trujillo M, Piacenza L, & Radi R (2018) Trypanothione functions in kinetoplastidia. *Glutathione*, ed Flohe LBoca Raton), p 410.

199. Trujillo M, *et al.* (2004) Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *The Journal of biological chemistry* 279(33):34175-34182.

200. Guerrero SA, *et al.* (2000) His-tagged tryparedoxin peroxidase of Trypanosoma cruzi as a tool for drug screening. *Applied microbiology and biotechnology* 53(4):410-414.

201. Wilkinson SR, *et al.* (2002) The Trypanosoma cruzi enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *The Journal of biological chemistry* 277(19):17062-17071.

202. Wilkinson SR, Meyer DJ, & Kelly JM (2000) Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *The Biochemical journal* 352 Pt 3:755-761.

203. Wilkinson SR, *et al.* (2002) TcGPXII, a glutathione-dependent Trypanosoma cruzi peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal* 364(Pt 3):787-794.

204. Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, & Kelly JM (2002) Trypanosoma cruzi expresses a plant-like ascorbatedependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21):13453-13458.

205. Yadav RK, Dolai S, Pal S, & Adak S (2008) Role of tryptophan-208 residue in cytochrome c oxidation by ascorbate peroxidase from Leishmania major-kinetic studies on Trp208Phe mutant and wild type enzyme. *Biochimica et biophysica acta* 1784(5):863-871.

Logan FJ, Taylor MC, Wilkinson SR, Kaur H, & Kelly JM (2007) The terminal step in vitamin C biosynthesis in Trypanosoma cruzi is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase. *The Biochemical journal* 407(3):419-426.
Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Horn D, & Kelly JM (2005) Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: A role for the glycosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(33):11645-11650.

208. Hugo M (2014) Sistemas enzimáticos de detoxificación de oxidantes en patógenos intracelulares. PhD (UDELAR, Facultad de Ciencias).

209. Ismail SO, *et al.* (1997) Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from Trypanosoma cruzi. *Molecular and biochemical parasitology* 86(2):187-197.

210. Temperton NJ, Wilkinson SR, & Kelly JM (1996) Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from Trypanosoma cruzi. *Molecular and biochemical parasitology* 76(1-2):339-343.

211. Wilkinson SR, *et al.* (2006) Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in Trypanosoma brucei. *Free radical biology & medicine* 40(2):198-209.

212. Dufernez F, et al. (2006) The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in Trypanosoma brucei. *Free radical biology & medicine* 40(2):210-225.

213. Krauth-Siegel RL & Lüdemann H (1996) Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Molecular and biochemical parasitology* 80(2):203-208.

214. Krauth-Siegel RL & Ludemann H (1996) Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Mol Biochem Parasitol* 80(2):203-208.

215. Zamocky M, Furtmuller PG, & Obinger C (2010) Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Archives of biochemistry and biophysics* 500(1):45-57.

216. Adak S & Datta Alok K (2005) Leishmania major encodes an unusual peroxidase that is a close homologue of plant ascorbate peroxidase: a novel role of the transmembrane domain. *Biochemical Journal* 390(Pt 2):465-474.

217. Zamocky M, Gasselhuber B, Furtmuller PG, & Obinger C (2014) Turning points in the evolution of peroxidasecatalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71(23):4681-4696.

218. Dolai S, Yadav RK, Pal S, & Adak S (2008) Leishmania major ascorbate peroxidase overexpression protects cells against reactive oxygen species-mediated cardiolipin oxidation. *Free Radic Biol Med* 45(11):1520-1529.

219. Taylor MC, Lewis MD, Fortes Francisco A, Wilkinson SR, & Kelly JM (2015) The Trypanosoma cruzi vitamin C dependent peroxidase confers protection against oxidative stress but is not a determinant of virulence. *PLoS neglected tropical diseases* 9(4):e0003707.

220. Nogueira FB, *et al.* (2012) The level of ascorbate peroxidase is enhanced in benznidazole-resistant populations of Trypanosoma cruzi and its expression is modulated by stress generated by hydrogen peroxide. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(4):494-502.

221. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, & Crapo JD (1988) Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *The Journal of cell biology* 107(6 Pt 1):2169-2179.

222. Gray B & Carmichael AJ (1992) Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. *The Biochemical journal* 281 (Pt 3):795-802.

223. Marklund SL (1984) Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *The Journal of clinical investigation* 74(4):1398-1403.

224. Yost FJ, Jr. & Fridovich I (1973) An iron-containing superoxide dismutase from Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* 248(14):4905-4908.

225. Keele BB, Jr., McCord JM, & Fridovich I (1970) Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganesecontaining enzyme. *The Journal of biological chemistry* 245(22):6176-6181.

226. Benov LT & Fridovich I (1994) Escherichia coli expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry* 269(41):25310-25314.

227. Estrada D, *et al.* (2018) Cardiomyocyte diffusible redox mediators control Trypanosoma cruzi infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase. *The Biochemical journal.* 

228. Stallings WC, Pattridge KA, Strong RK, & Ludwig ML (1984) Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *The Journal of biological chemistry* 259(17):10695-10699.

229. Mandelli F, *et al.* (2013) The characterization of a thermostable and cambialistic superoxide dismutase from Thermus filiformis. *Letters in applied microbiology* 57(1):40-46.

230. Miller A-F (2012) Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. FEBS letters 586(5):585-595.

231. Ganini D, Santos JH, Bonini MG, & Mason RP (2018) Switch of Mitochondrial Superoxide Dismutase into a Prooxidant Peroxidase in Manganese-Deficient Cells and Mice. *Cell chemical biology* 25(4):413-425 e416.

232. Lah MS, *et al.* (1995) Structure-function in Escherichia coli iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from Thermus thermophilus. *Biochemistry* 34(5):1646-1660.

233. Sorkin DL, Duong DK, & Miller AF (1997) Mutation of tyrosine 34 to phenylalanine eliminates the active site pK of reduced iron-containing superoxide dismutase. *Biochemistry* 36(27):8202-8208.

234. Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, & Kang SO (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from Streptomyces spp. *Biochemical Journal* 318(Pt 3):889-896.

235. Spagnolo L, *et al.* (2004) Unique features of the sodC-encoded superoxide dismutase from Mycobacterium tuberculosis, a fully functional copper-containing enzyme lacking zinc in the active site. *The Journal of biological chemistry* 279(32):33447-33455.

236. Ischiropoulos H, et al. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. Archives of biochemistry and biophysics 298(2):431-437.

237. Xu D, Brandan CP, Basombrio MA, & Tarleton RL (2009) Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for Trypanosoma cruzi. *BMC microbiology* 9:90.

238. DaRocha WD, Otsu K, Teixeira SM, & Donelson JE (2004) Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in Trypanosoma cruzi. *Molecular and biochemical parasitology* 133(2):175-186.

239. Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, & Tarleton RL (2014) CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in Trypanosoma cruzi. *mBio* 6(1):e02097-02014.

240. Lander N, Chiurillo MA, Storey M, Vercesi AE, & Docampo R (2016) CRISPR/Cas9-mediated endogenous Cterminal Tagging of Trypanosoma cruzi Genes Reveals the Acidocalcisome Localization of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *The Journal of biological chemistry* 291(49):25505-25515.

241. Lander N, Li ZH, Niyogi S, & Docampo R (2015) CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in Trypanosoma cruzi Reveals Their Role in Flagellar Attachment. *mBio* 6(4):e01012.

Ariyanayagam MR, Oza SL, Guther ML, & Fairlamb AH (2005) Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. *The Biochemical journal* 391(Pt 2):425-432.

243. Comini MA, *et al.* (2004) Validation of Trypanosoma brucei trypanothione synthetase as drug target. *Free radical biology & medicine* 36(10):1289-1302.

244. Krieger S, *et al.* (2000) Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular microbiology* 35(3):542-552.

245. Kelly JM, Taylor MC, Smith K, Hunter KJ, & Fairlamb AH (1993) Phenotype of recombinant Leishmania donovani and Trypanosoma cruzi which over-express trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. *European journal of biochemistry* 218(1):29-37.

246. Wilkinson SR, Horn D, Prathalingam SR, & Kelly JM (2003) RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome. *The Journal of biological chemistry* 278(34):31640-31646.

247. Comini MA, Krauth-Siegel RL, & Flohe L (2007) Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *The Biochemical journal* 402(1):43-49.

248. Wilkinson SR, Temperton NJ, Mondragon A, & Kelly JM (2000) Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in Trypanosoma cruzi. *The Journal of biological chemistry* 275(11):8220-8225.

249. Pineyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, & Robello C (2008) Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408(1-2):45-50.

250. Temperton NJ, Wilkinson SR, Meyer DJ, & Kelly JM (1998) Overexpression of superoxide dismutase in Trypanosoma cruzi results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular and biochemical parasitology* 96(1-2):167-176.

251. Prathalingham SR, Wilkinson SR, Horn D, & Kelly JM (2007) Deletion of the Trypanosoma brucei superoxide dismutase gene sodb1 increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(2):755-758.

252. Hughes MN & Nicklin HG (1970) A possible role for the species peroxonitrite in nitrification. *Biochimica et biophysica acta* 222(3):660-661.

253. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.

254. Crow JP, Sampson JB, Zhuang Y, Thompson JA, & Beckman JS (1997) Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem* 69(5):1936-1944.

255. Peskin AV & Winterbourn CC (2006) Taurine chloramine is more selective than hypochlorous acid at targeting critical cysteines and inactivating creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Free radical biology & medicine* 40(1):45-53.

256. Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Freeman BA, & Radi R (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *The Journal of biological chemistry* 274(2):842-848.

257. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics 82(1):70-77.

258. Brito C, *et al.* (1999) Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *Journal of immunology* 162(6):3356-3366.

Peloso EF, et al. (2012) Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to Trypanosoma cruzi epimastigotes growth phases. Archives of biochemistry and biophysics 520(2):117-122.
Romero N, et al. (2003) Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. The Journal of biological chemistry 278(45):44049-44057.

261. Hellman U (2000) Sample preparation by SDS/PAGE and in-gel digestion. EXS 88:43-54.

262. Nicholls SJ, Shen Z, Fu X, Levison BS, & Hazen SL (2005) Quantification of 3-nitrotyrosine levels using a benchtop ion trap mass spectrometry method. *Methods in enzymology* 396:245-266.

263. Turko IV & Murad F (2005) Mapping sites of tyrosine nitration by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Methods in enzymology* 396:266-275.

264. Taylor MC & Kelly JM (2006) pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for Trypanosoma cruzi. *BMC biotechnology* 6:32.

265. Forman HJ & Fridovich I (1973) Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Archives of biochemistry and biophysics* 158(1):396-400.

266. Crow JP, Beckman JS, & McCord JM (1995) Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry* 34(11):3544-3552.

267. Alvarez B, et al. (2004) Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free radical biology & medicine* 37(6):813-822.

268. Radi R (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(12):4003-4008.

269. Tien M, Berlett BS, Levine RL, Chock PB, & Stadtman ER (1999) Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(14):7809-7814.

270. Pryor WA, Lemercier JN, Zhang H, Uppu RM, & Squadrito GL (1997) The catalytic role of carbon dioxide in the decomposition of peroxynitrite. *Free radical biology & medicine* 23(2):331-338.

271. Koppenol WH & Kissner R (1998) Can O=NOOH undergo homolysis? *Chemical research in toxicology* 11(2):87-90.

272. Surmeli NB, Litterman NK, Miller AF, & Groves JT (2010) Peroxynitrite mediates active site tyrosine nitration in manganese superoxide dismutase. Evidence of a role for the carbonate radical anion. *Journal of the American Chemical Society* 132(48):17174-17185.

273. Bachega JF, *et al.* (2009) Systematic structural studies of iron superoxide dismutases from human parasites and a statistical coupling analysis of metal binding specificity. *Proteins* 77(1):26-37.

274. Boucher IW, *et al.* (2006) The crystal structure of superoxide dismutase from Plasmodium falciparum. *BMC structural biology* 6:20.

275. Guan Y, *et al.* (1998) Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochemistry* 37(14):4722-4730.

276. Reece SY, Hodgkiss JM, Stubbe J, & Nocera DG (2006) Proton-coupled electron transfer: the mechanistic underpinning for radical transport and catalysis in biology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361(1472):1351-1364.

277. Bhattacharjee S, et al. (2007) Electron transfer between a tyrosyl radical and a cysteine residue in hemoproteins: spin trapping analysis. *Journal of the American Chemical Society* 129(44):13493-13501.

278. Prutz WA, Butler J, Land EJ, & Swallow AJ (1989) The role of sulphur peptide functions in free radical transfer: a pulse radiolysis study. *International journal of radiation biology* 55(4):539-556.

279. Rova U, et al. (1995) Evidence by site-directed mutagenesis supports long-range electron transfer in mouse ribonucleotide reductase. *Biochemistry* 34(13):4267-4275.

280. Petruk AA, *et al.* (2012) Molecular basis of intramolecular electron transfer in proteins during radical-mediated oxidations: computer simulation studies in model tyrosine-cysteine peptides in solution. *Archives of biochemistry and biophysics* 525(1):82-91.

Witting PK & Mauk AG (2001) Reaction of human myoglobin and H2O2. Electron transfer between tyrosine 103 phenoxyl radical and cysteine 110 yields a protein-thiyl radical. *The Journal of biological chemistry* 276(19):16540-16547.
Li H, Robertson AD, & Jensen JH (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins* 61(4):704-721.

283. Bas DC, Rogers DM, & Jensen JH (2008) Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins* 73(3):765-783.

284. Olsson MH, Sondergaard CR, Rostkowski M, & Jensen JH (2011) PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of chemical theory and computation* 7(2):525-537.

285. Sondergaard CR, Olsson MH, Rostkowski M, & Jensen JH (2011) Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *Journal of chemical theory and computation* 7(7):2284-2295.

286. Giese B, Graber M, & Cordes M (2008) Electron transfer in peptides and proteins. *Current opinion in chemical biology* 12(6):755-759.

287. Cordes M, et al. (2008) Influence of amino acid side chains on long-distance electron transfer in peptides: electron hopping via "stepping stones". *Angewandte Chemie* 47(18):3461-3463.

288. Shih C, et al. (2008) Tryptophan-accelerated electron flow through proteins. Science 320(5884):1760-1762.

289. Aubert C, Vos MH, Mathis P, Eker AP, & Brettel K (2000) Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* 405(6786):586-590.

290. Graceffa P (1983) Spin labeling of protein sulfhydryl groups by spin trapping a sulfur radical: application to bovine serum albumin and myosin. *Archives of biochemistry and biophysics* 225(2):802-808.

291. Maples KR, Jordan SJ, & Mason RP (1988) In vivo rat hemoglobin thiyl free radical formation following administration of phenylhydrazine and hydrazine-based drugs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 16(6):799-803.

292. Gatti RM, Radi R, & Augusto O (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS letters* 348(3):287-290.

293. Moreno DM, *et al.* (2011) Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration. *Archives of biochemistry and biophysics* 507(2):304-309.

294. Piacenza L, Peluffo G, & Radi R (2001) L-arginine-dependent suppression of apoptosis in Trypanosoma cruzi: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13):7301-7306.

295. Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, & Goldenberg S (1988) Cell-substrate adhesion during Trypanosoma cruzi differentiation. *The Journal of cell biology* 106(4):1349-1358.

296. Choi KD, Vodyanik M, & Slukvin, II (2011) Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nature protocols* 6(3):296-313.

297. Martinez-Calvillo S, Lopez I, & Hernandez R (1997) pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of Trypanosoma cruzi transfectants. *Gene* 199(1-2):71-76.

298. Flohe L & Otting F (1984) Superoxide dismutase assays. Methods in enzymology 105:93-104.

299. Crapo JD, McCord JM, & Fridovich I (1978) Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods in enzymology* 53:382-393.

300. Beyer WF, Jr. & Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry* 161(2):559-566.

301. Rios N, *et al.* (2016) Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluoresceinboronate. *Free radical biology & medicine* 101:284-295.

302. Tanaka Y, Tanowitz H, & Bloom BR (1983) Growth of Trypanosoma cruzi in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. *Infection and immunity* 41(3):1322-1331.

303. Cardoni RL, Antunez MI, Morales C, & Nantes IR (1997) Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with Trypanosoma cruzi. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 56(3):329-334.

304. Massey V (1959) The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochimica et biophysica acta* 34:255-256.

305. Zhao H, *et al.* (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(16):5727-5732.

306. Zielonka J, Zhao H, Xu Y, & Kalyanaraman B (2005) Mechanistic similarities between oxidation of hydroethidine by Fremy's salt and superoxide: stopped-flow optical and EPR studies. *Free radical biology & medicine* 39(7):853-863.

307. Baehner RL, Boxer LA, & Davis J (1976) The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 48(2):309-313.

308. Araújo-Jorge TCdC, Solange Lisboa de ed (2000) *Doença de chagas: manual para experimentação animal* (Editora FIOCRUZ), p 368.

309. Atwood JA, 3rd, et al. (2005) The Trypanosoma cruzi proteome. Science 309(5733):473-476.

310. Feelisch M, Ostrowski J, & Noack E (1989) On the mechanism of NO release from sydnonimines. *Journal of cardiovascular pharmacology* 14 Suppl 11:S13-22.

311. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martinez A, & Radi R (2012) Trypanosoma cruzi Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxidants & redox signaling*.

312. McCord JM & Fridovich I (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *The Journal of biological chemistry* 243(21):5753-5760.

313. Zielonka J, Vasquez-Vivar J, & Kalyanaraman B (2008) Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nature protocols* 3(1):8-21.

314. Zielonka J, *et al.* (2014) High-throughput assays for superoxide and hydrogen peroxide: design of a screening workflow to identify inhibitors of NADPH oxidases. *The Journal of biological chemistry* 289(23):16176-16189.

315. Sokolovska A, Becker CE, & Stuart LM (2012) Measurement of phagocytosis, phagosome acidification, and intracellular killing of Staphylococcus aureus. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 14:Unit14 30.

316. Jasion VS, Polanco JA, Meharenna YT, Li H, & Poulos TL (2011) Crystal structure of Leishmania major peroxidase and characterization of the compound i tryptophan radical. *The Journal of biological chemistry* 286(28):24608-24615.

317. Patterson WR, Poulos TL, & Goodin DB (1995) Identification of a porphyrin pi cation radical in ascorbate peroxidase compound I. *Biochemistry* 34(13):4342-4345.

318. Erman JE, Vitello LB, Mauro JM, & Kraut J (1989) Detection of an oxyferryl porphyrin pi-cation-radical intermediate in the reaction between hydrogen peroxide and a mutant yeast cytochrome c peroxidase. Evidence for tryptophan-191 involvement in the radical site of compound I. *Biochemistry* 28(20):7992-7995.

319. Detweiler CD, et al. (2002) Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide. *Free radical biology & medicine* 33(3):364-369.

320. Gupta S, *et al.* (2009) Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free radical biology & medicine* 47(10):1414-1421.

321. Pineyro MD, Arcari T, Robello C, Radi R, & Trujillo M (2011) Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics* 507(2):287-295.

## Anexo - Abreviaturas

2		
	2-OH-E⁺	2-hidroxietidio
3		
	3-NT	3-nitrotirosina
A		
	AA ACN APx APx-CcP	Antimicina A Acetonitrilo Ascorbato peroxidasa Ascorbato peroxidasa de <i>T. cruzi</i>
В		
	B-A1 BHI BMDM BSA	Bafilomicina A1 Medio de cultivo "brain heart infusion" Macrófagos derivados de médula ósea Albúmina sérica bovina
С		
	CaM CcP CGD CO <sub>3</sub> •- CPX Cu Cyt c Cyt c	Calmodulina Citocromo c peroxidasa Enfermedad granulomatosa crónica Radical carbonato Peroxirredoxina citosólica de <i>T. cruzi</i> Cobre Citocromo c Citocromo c reducido
D		
	DAPI DBNBS DHE DMEM	4',6-diamino-2-fenilindol 3,5-dibromo-4-nitrosobencenosulfonato Dihidroetidio Medio de cultivo "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"

DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
dPBS	Solución "Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline"
DPI	Difeniliodonio
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol

#### Ε

E <sup>+</sup>	Etidio
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPR	Resonancia paramagnética de electrones

# F

FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
Fe	Hierro
Fe <sup>+4</sup> =0	Oxoferrilo
Fe-SODA	Superóxido dismutasa mitochondrial de T. cruzi
Fe-SODB	Superóxido dismutasa citosólica de T. cruzi
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL-B	Fluoresceína boronato
FMN	Flavin mononucleótido

#### G

G418	Geneticina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutatión

#### Η

H <sub>4</sub> B	Tetrahidrobiopterina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HRP	Peroxidasa de rábano

#### 1

IET	Transferencia de electrones intramolecular
IFN-γ	Interferón-gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido

\_\_\_\_\_

125

Medio de cultivo "Luria-Bertani"
L-arginina metil ester
Radical lipídico peroxilo
Lipopolisacárido

#### Μ

Mn	Manganeso
MPO	Mieloperoxidasa
MPX	Peroxirredoxina mitocondrial de T. cruzi

#### Ν

N2O3 N2O4	Óxido de nitrógeno (III) Óxido de nitrógeno (IV)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitro blue tetrazolium
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
•NO	Óxido nítrico
•NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> -	Nitrato
NOC-12	1-hidroxi-2-oxo-3-(N-etil-2-aminoetil)-3-etil-1-triazeno
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS-2	Óxido nítrico sintasa inducible
NOX	NADPH oxidasa
NOX-2	NADPH oxidasa-2
NPPB	Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico

#### 0

O <sub>2</sub> •-	Superóxido
•ОН	Radical hidroxilo
O/N	Durante toda la noche
ONO0 <sup>-</sup>	Peroxinitrito anión
ONOOCO2 <sup>-</sup>	Nitrosoperoxocarboxilato
ONOOH	Ácido peroxinitroso

#### Ρ

	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	PBN	4-(2-piridilazo)-resorcinol y fenil-N-butil nitrona
	PBS	Buffer fosfato salino
	PFA	Paraformaldehído
	PMN	Polimorfonuclear/es
R		
	RNS	Especies reactivas del nitrógeno
	ROS	Especies reactivas del oxígeno
S		
	SBF	Suero bovino fetal
	SDS	Dodecilsulfato sódico
	SIN-1	3-morfolinosidnonimina
	SOD	Superóxido dismutasa
Т		
		A see desta see tidada da 🛨 see ti
		Ascorbato peroxidasa de <i>L. cruzi</i>
		Giulation peroxidasa de <i>1. cruzi</i>
		Tripapotiona roductasa
	Trys	Tripanotiona sintetasa
	TS	Trinanotiona sintetasa
		Tripanotiona oxidada
	T(SH) <sub>2</sub>	Tripanotiona reducida
	TXN	Triparredoxina
X		
	x	Xantina
	XO	Xantina oxidasa
<u>Z</u>		
	Zn	Zinc